

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---

## ***RIGORÓZNÍ PRÁCE***

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVI.  
Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterasu.

Biological activity of plant metabolites XVI.  
Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on  
acetylcholinesterase.

**Školitel : doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.**

**Hradec Králové, srpen 2007**

**Mgr. Šárka Bryndová**

Děkuji panu doc. RNDr. Opletalovi, CSc. za vedení, poskytnutí odborné literatury, materiálů, cenných rad, zkušeností a připomínek při vypracování mé rigorózní práce. Dále pak děkuji Mgr. Danielu Junovi, PhD. (Univerzita obrany v Praze, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové) za provedené práce při zjišťování biologické aktivity izolovaná látky.

# OBSAH

<b>OBSAH .....</b>	<b>3</b>
<b>ZKRATKY .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 CÍL .....</b>	<b>10</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 ALZHEIMEROVA NEMOC .....</b>	<b>13</b>
3.1.1 Klinický obraz AD .....	13
3.1.1.1 Lehká demence .....	13
3.1.1.2 Střední stadium demence .....	14
3.1.1.3 Těžké stadium demence .....	15
3.1.2 Diagnostika AD .....	16
3.1.2.1 Test hodin, MMSE test .....	17
3.1.2.2 CT .....	17
3.1.2.3 NMR .....	17
3.1.2.4 PET .....	18
3.1.2.5 SPECT .....	19
3.1.3 Neurobiologické změny .....	19
3.1.3.1 Senilní plaky .....	19
3.1.3.2 Tau-protein, neuronální klubka .....	20
3.1.3.3 Apolipoprotein E .....	20
3.1.3.4 Oxidativní stres .....	21
3.1.3.5 Změny neurotransmiterových systémů .....	21
3.1.4 Příčiny AD .....	21
3.1.5 Rizikové faktory AD .....	21
<b>3.2 TERAPIE AD .....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Kognitivní farmakoterapie AD .....	23
3.2.1.1 Substituce nedostatkovými neurotransmitery nebo neuromodulátory .....	23

3.2.1.2	Ovlivnění neuronálního metabolismu .....	26
3.2.1.3	Scavengery ROS .....	27
3.2.1.4	Ovlivnění excitotoxicity .....	28
3.2.1.5	Nervové růstové faktory .....	28
3.2.1.6	Protizánětlivé látky, estrogény, statiny .....	28
3.2.2	Nekognitivní farmakoterapie AD .....	29
<b>3.3</b>	<b>INHIBITORY AChE – PŘÍRODNÍ LÁTKY .....</b>	<b>29</b>
3.3.1	Ovlivnění osudu ACh a AChE .....	30
3.3.1.1	M2-antagonisté .....	30
3.3.1.2	Látky jiného působení .....	30
3.3.1.3	Inhibitory AChE .....	30
3.3.2	Inhibitory ACAT .....	31
3.3.3	Ovlivnění produkce amyloidu .....	31
3.3.4	Neuroprotektiva.....	31
3.3.5	Inhibitory prolylendopeptidasy.....	31
<b>3.4</b>	<b>Chelidonium majus L.....</b>	<b>32</b>
3.4.1	Botanický popis.....	32
3.4.2	Systematika .....	32
3.4.3	Obsahové látky .....	33
3.4.4	Farmakologické účinky, využití rostliny v praxi.....	39
3.4.4.1	Protinádorové a antivirové účinky .....	39
3.4.4.2	Antimikrobiální a antimykotické účinky .....	41
3.4.4.3	Hepatotropní a spasmolytické účinky .....	41
3.4.4.4	Biologické účinky hlavních obsahových látek .....	42
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>VŠEOBECNÉ POSTUPY .....</b>	<b>45</b>
4.1.1	Destilace a odpařování rozpouštědel .....	45
4.1.2	Sloupcová chromatografie .....	45
4.1.3	Tenkvrstvá chromatografie.....	45
4.1.4	Sušení.....	46
<b>4.2</b>	<b>POTŘEBY.....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Izolační část .....	46

4.2.1.1	Chromatografické adsorbenty .....	46
4.2.1.2	Chromatografické soustavy .....	47
4.2.1.3	Chemikálie .....	47
4.2.1.4	Činidla .....	47
4.2.1.5	Rozpouštědla .....	48
4.2.1.6	Standardní látky .....	48
4.2.2	Biochemická část .....	48
4.2.2.1	Chemikálie a materiál .....	48
4.2.2.2	Přístroje .....	48
<b>4.3</b>	<b>IZOLACE ALKALOIDŮ .....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Materiál .....	49
4.3.2	Příprava extraktu a jeho čištění .....	49
4.3.3	Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu .....	50
4.3.4	Čištění surového výtřepku A .....	50
4.3.5	Příprava pseudokyanidů .....	50
4.3.6	Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových bazí .....	51
4.3.7	Příprava fenolových alkaloidů z výtřepku A .....	51
4.3.8	Příprava vyčištěného výtřepku A .....	51
4.3.9	Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich .....	52
4.3.10	Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC) .....	52
4.3.11	Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD) .....	52
4.3.12	Sloupcová chromatografie benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů .....	54
4.3.13	Čištění frakcí 21-36 (sanguinarin) .....	56
4.3.14	Výsledky izolace .....	56
<b>4.4</b>	<b>STANOVENÍ ÚČINKU ALKALOIDU NA ERYTROCYTÁRNÍ ACHE (IC<sub>50</sub>) .....</b>	<b>57</b>
4.4.1	Podmínky měření .....	57
4.4.2	Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů .....	57
4.4.3	Stanovení hodnot IC <sub>50</sub> .....	57
4.4.4	Matematické zpracování experimentálních dat .....	58
4.4.5	Výsledky biochemické části .....	58

5	DISKUSE .....	59
6	SOUHRN.....	63
7	LITERATURA .....	65

## **ZKRATKY**

AcOH	kyselina octová
AD	Alzheimerova nemoc
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitory AChE
APLs	allostericky potencující ligandy
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
BuChE	butyrylcholinesterasa
CCH	civilizační choroba
CT	počítačová tomografie
DNTB	5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
EtOH	ethanol 95%
HACU	high affinity cholin uptake
HCl	kyselina chlorovodíková
ChAT	cholinacetyltransferasa
LPS	lipopolysacharid
MAO	monoaminoxidasa
MMSE	mini mental state examination
NMR	nukleární magnetická resonance
PET	pozitronová emisní tomografie
Ps-kyanidy	pseudokyanidy
R <sub>f</sub>	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
TNF	tumor nekrotizující faktor
To	toluen

## **1 ÚVOD**



Alzheimerova choroba (AD) patří spolu s Parkinsonovou chorobou mezi neurodegenerativní onemocnění mozku. Tato onemocnění lze zařadit do skupiny civilizačních chorob, které postihují stále více lidí v rozvinutých státech.

Nemoc popsal na počátku 20. století německý lékař Alois Alzheimer a byla chorobou vzácnou a neobvyklou. Dnes trpí touto nemocí každý dvacátý člověk starší 65 let, po 80. roce života již každý pátý. Dle odhadu trpí tímto onemocněním v ČR asi 50 - 70 000 osob a celkově 17 - 25 milionů lidí na celém světě.<sup>1</sup>

AD nelze vyléčit, vhodnou a včasnou léčbou lze však oddálit propuknutí nemoci v plné síle a zmírnit příznaky. Průběh nemoci můžeme ovlivnit způsobem života, který vedeme před vypuknutím nemoci. Je známo, že u lidí s aktivním životním stylem, bohatým duševním životem a trénovaným intelektem je průběh onemocnění pomalejší. Jednoznačné je, že určité činnosti mozku velmi prospívají. Patří k nim učení se novým věcem, jako např. učit se pracovat s počítačem, navštěvovat galerie a obrazárny. Dále je pak prospěšné luštění křížovek, četba, hraní her náročných na pozornost (jako např. karty, šachy, scrabble), cestování, pěší turistika a mnohé další činnosti. Naopak jsou známy činnosti, které naprosto mozku neprospívají. Jsou to deprese, při trvalém smutku se činnost mozku tlumí. Alkohol, který způsobuje ve větším množství akutní i chronické poruchy paměti a dalších funkcí mozku. Dále pak mozku neprospívá nečinnost a některé druhy běžně používaných léků. AD nepostihuje pouze nemocného, ale i celou jeho rodinu. Péče o blízkou osobu představuje pro pečujícího nelehkou zátěž.

V dnešní době jsou při léčbě AD k dispozici léky, které mohou zlepšit kvalitu života nemocného v rané a střední fázi onemocnění. Jedná se mimo jiné o inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI), enzymu hydrolyzujícího acetylcholin na cholinergních synapsích a nervosvalových zakončeních při nervovém přenosu. Používají se látky z mnoha chemických skupin. V oblasti přírodních látek se provádí výzkum a hledají se přírodní zdroje, které by mohly být přínosem pro léčbu AD. Jednou z rostlin, o které je známo, že její obsahové látky ovlivňují acetylcholinesterasu je *Chelidonium majus* L.

**2 CÍL**

Cílem rigorózní práce bylo spolu s dalšími doktorandkami (Janou Nagyovou, Evou Vítkovou, Dagmar Kubincovou):

1. Provést extrakci 41,8 kg suché nati s kořeny z rostliny *Chelidonium majus* L., tento primární extrakt vyčistit a připravit sekvenčním postupem frakce s jednotlivými typy alkaloidů.
2. Zpracovat směs benzofenanthridinových bazí a získat jeden alkaloid v čisté formě.
3. Podílet se na stanovení biologické aktivity vůči erytrocytární AChE *in vitro*.

### **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1 ALZHEIMEROVA NEMOC**

AD tvoří 50-60 % všech demencí. Předpokládá se, že tímto onemocněním trpí každý desátý člověk starší 65 let až každý druhý starší 85 let.

Podle doby objevení se prvních příznaků se AD dělí na presenilní a senilní formu. Presenilní forma je forma s časným začátkem, příznaky se objeví před 65. rokem života. Senilní forma je forma s pozdním začátkem, příznaky se objeví v 65. roce a později.

Z hlediska dědičnosti se vyskytuje ve dvou formách. Familiární forma je forma děděná v rodině z generace na generaci, je velmi vzácná, tvoří 1-5 % všech případů AD. Tato forma postihuje člověka obvykle po padesátém roce života. Druhá forma, forma sporadická, se vyskytuje zdánlivě náhodně a představuje naprostou většinu případů.<sup>2</sup>

#### **3.1.1 Klinický obraz AD**

Pro AD je typický plíživý, pomalý začátek. Rozlišení prvních poruch paměti od příznaků, které mohou doprovázet normální stárnutí, nemusí být zpočátku jednoduché.<sup>2</sup> Blízcí si u nemocného něčeho všimnou často až ve chvíli, kdy závažně selže v běžném životě. Rychlost zhoršování příznaků je u každého jiná. Od prvních příznaků do úmrtí trvá nemoc průměrně deset let, ale jsou velké individuální rozdíly. Běžně se rozlišují tři stadia vývoje onemocnění.<sup>1</sup>

##### **3.1.1.1 LEHKÁ DEMENCE**

Počáteční stadium nemoci si můžete snadno splést s přirozeným stárnutím. Nejdříve dochází k poruchám paměti. Lidé je často považují za běžný projev stárnutí. Člověk zapomíná, není si schopen zapamatovat nové věci. Naopak si někdy dobře vybavuje vzpomínky z mládí, rád o nich opakovaně do omrzení mluví. Zhoršuje se jeho obrazová představivost a logické uvažování, schopnost úsudku a počítání. Objevují se poruchy prostorové orientace. Nemocný bloudí na méně známých místech. Trpí také přechodnou časovou dezorientací. Není schopen vybavit si, jaký

je den, měsíc nebo rok. Má sníženou schopnost plynulého vyjadřování a mohou se vyskytnout i první psychologické příznaky a poruchy chování - deprese, poruchy vnímání, ojediněle i bludy.

Když jsou přivedeni k lékaři a dostávají otázky, otáčejí se bezradně na doprovázejícího příbuzného - příznak otáčení hlavy. Pacient je však schopen základní péče o sebe sama, i když se u něj může vyskytnout ztráta iniciativy a průbojnosti. Často založí někde peníze, dokumenty, klíče a není schopen je najít.

Poruch paměti si nemocní nebývají vědomi, cítí se často zdrávi. Podezírají někdy blízké, že jim věci schovávají. Popírají své problémy, odmítají možnost, že by se jim zhoršovala paměť. Zůstává jim schopnost povrchně diskutovat a společensky povídat. Někdy kontrastuje s podezíráním blízkých naivní důvěra, se kterou se svěřují cizím lidem. Mění se osobnost a povaha nemocných, jsou zvýšeně sobečtí, soustředění jen na sebe.<sup>1</sup>

#### Problémy lehkého stadia demence:

- obtížné dorozumění
- zapomínání
- zakládání věcí
- podezíravost, vztahovačnost
- popírání problémů, poruch paměti
- dezorientace v čase
- bloudění na známých místech
- obtížné rozhodování, bezradnost
- příznak "otáčení hlavy"
- ztráta iniciativy
- známky deprese, úzkosti a agresivity
- ztráta zájmu o koníčky
- změna osobnosti, sobeckost a egocentričnost

#### *3.1.1.2 STŘEDNÍ STADIUM DEMENCE*

S postupem času můžeme u postiženého sledovat již závažnější příznaky a problémy, které mu znemožňují vykonávat běžné denní činnosti. Jsou to hlavně

neschopnost se soustředit a výrazné výpadky paměti. Nedovede pojmenovat známé věci, z paměti vypadávají běžná slova.

Zhoršuje se a ztrácí se schopnost počítat, číst a psát. Zůstávají zachovány útržky vzpomínek na události z mládí. Dále bývají poruchy soudnosti, těžší formy poruchy časové a prostorové orientace a také zhoršování řečových schopností.

Objevují se výraznější poruchy chování, halucinace a bludy. Myslí si, že mu někdo chodí do bytu, podezírá a obviňuje blízké, sousedy nebo zcela cizí osoby z krádeží. Pacient je již z velké části odkázán na péči okolí. Má potíže s dodržováním hygieny, nedovede se přiměřeně obléci, udržovat si své věci v pořádku.

Mohou se již objevovat i přechodné odpolední a noční stavy zmatenosti - jedná se o poruchy vědomí, odborně nazývané deliria. Častější je také bloudění, ztrácení se. Přesto zůstává zachovaná schopnost vést povrchní společenskou konverzaci. Na první dojem mohou být nenápadní, postižení paměti není při krátkém kontaktu patrné. Prohlubuje se změna osobnosti, egocentričnost, sobeckost.<sup>1</sup>

#### Problémy středního stádia demence

- ztráta paměti
- poruchy soudnosti, nekritičnost
- prohlubování změn osobnosti, sobeckost, egocentričnost
- neschopnost vykonávat běžné aktivity - vaření, nakupování, úklid
- potřeba pomoci při mytí, vykonávání osobní hygieny a oblékání
- obtížná komunikace
- zatoulávání se, bloudění
- poruchy chování, agrese
- halucinace, podezřívavé chování, bludná vztahovačnost, bludy okrádanosti, obviňování blízkých
- stavy zmatenosti – deliria

#### *3.1.1.3 TĚŽKÉ STADIUM DEMENCE*

U pacienta se vyskytují poruchy chůze, pády, neurologické poruchy, poruchy chování - především agresivita, odpolední a noční stavy zmatenosti. Nemocný je

zcela závislý na cizí pomoci. Dochází k naprosté ztrátě soběstačnosti, nemocný je ve všem zcela odkázán na pečovatele.

Nepoznává přátele ani členy vlastní rodiny, má obtíže při příjmu potravy a s dodržování pravidelné osobní hygieny. Nemocný neudrží moč a stolici, neřekne si včas, že potřebuje na stranu. I při zajištění dostatečného příjmu potravy a tekutin nemocní chátrají a někdy rychle hubnou.

Dále se zhoršuje schopnost řeči. Nemocný opakuje jedno nebo několik slov či větu, někdy přestane mluvit úplně. V posledním stadiu onemocnění AD se u něj mohou objevit další souběžné nemoci. Tyto, jinak mnohdy zanedbatelné choroby, mohou být pro pacienta s AD rizikové a život ohrožující.<sup>1</sup>

#### Problémy těžkého stadia demence:

- poruchy příjmu potravy
- nerozpoznání blízkých osob
- nechápání okolního dění
- ztráta schopnosti souvislé řeči, opakování slov, vět, křik
- odpolední a noční stavy zmatenosti - deliria
- obtížná chůze
- poruchy vylučování moči a stolice, inkontinence
- chování neodpovídající situaci
- úplná ztráta soběstačnosti, ve všem závisí na pečovateli
- upoutání na invalidní vozík
- těžké duševní i tělesné chátrání, hubnutí<sup>1</sup>

### **3.1.2 Diagnostika AD**

Diagnóza AD vychází z diagnózy syndromu demence. Základním krokem je tedy zjištění přítomnosti demence. Pro zjištění demence je důležité klinické vyšetření, anamnestické údaje, je možné použít testové metody.<sup>2</sup>

Z pomocných vyšetření je možno využít zobrazovací metody počítačové tomografie (CT) a nukleární magnetické rezonance (NMR) mozku.



### 3.1.2.1 TEST HODIN, MMSE TEST

Test hodin představuje citlivou metodu pro odhalení již počátečních stádií AD. Jeho podstatou je jednoduchý úkol. Nakreslit hodiny. Vyšetřovanému se předloží tužka a papír s předkresleným kruhem. Je požádán, aby doplnil všechna čísla tak, aby vznikl hodinový ciferník. Po nakreslení hodin je dalším úkolem doplnit ručičky hodin tak, aby hodiny ukazovaly čas 11:10.

Dalším testem je MMSE test. Jedná se o standard pro vyšetřování poruch paměti u demencí.<sup>3</sup>

Obr. č. 1 Test hodin

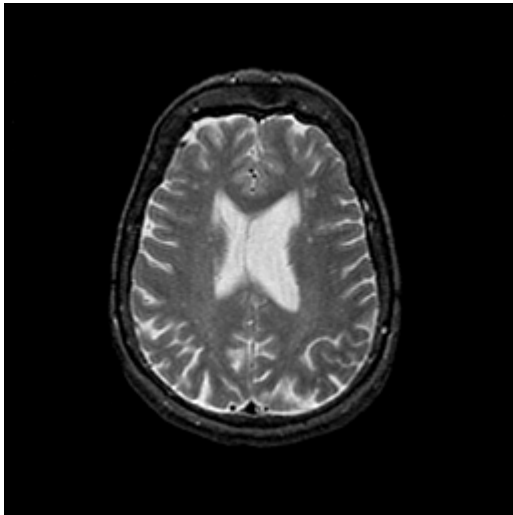


### 3.1.2.2 CT

CT vyšetření dokáže pomocí rentgenových paprsků zobrazit mozek vyšetřované osoby. Na snímcích si lékař všímá rozměrů jeho jednotlivých částí. Při AD dochází k úbytku nervových buněk. Mozek nemocného je proto menší, mozková kůra je tenčí (atrofická).<sup>3</sup>

### 3.1.2.3 NMR

NMR umí podrobněji zobrazit mozkovou tkáň. Výhodné je opakovat vyšetření s odstupem několika měsíců a sledovat případné změny ve velikosti a struktuře mozku. Typické jsou zvláště změny některých jeho částí. Například centra paměti, tzv. hipokampy, atrofizují rychleji.<sup>3</sup>



Obr. č. 2 NMR zobrazení normálně stárnoucího mozku

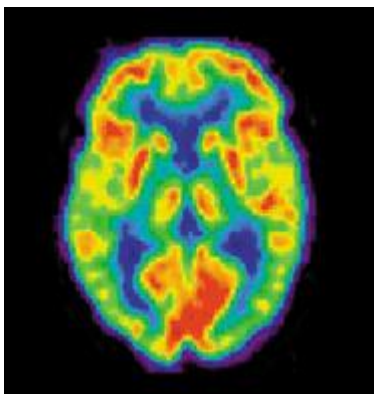


Obr. č. 3 NMR vyšetření mozku postiženého Alzheimerovou chorobou

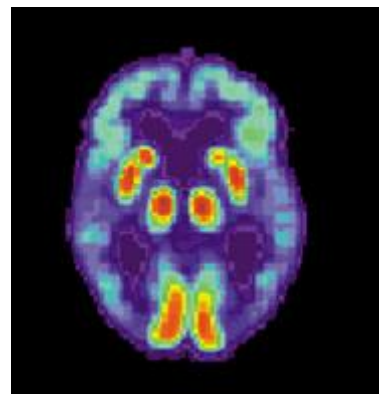
Kromě zobrazovacích metod se začínají používat i nová vyšetření sledující funkční změny v nervové tkáni. Ani ty však neumožňují jednoznačně stanovit diagnózu. Jejich použití je zatím předmětem výzkumu. Mezi tyto metody patří pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní tomografie (SPECT).<sup>3</sup>

#### 3.1.2.4 PET

PET zobrazuje aktuální metabolické funkce různých oddílů mozku. Pro AD může být charakteristický pokles využívané energie v některých částech mozku.<sup>3</sup>



Obr. č. 4 PET zobrazení normálního mozku

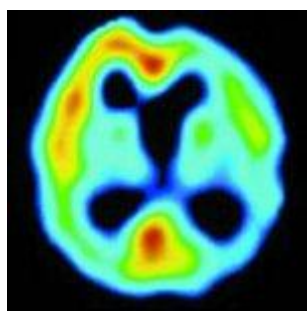


Obr. č. 5 PET zobrazení mozku pacienta s Alzheimerovou chorobou

#### 3.1.2.5 SPECT

SPECT si všímá průtoku krve mozkem a zásobení jeho jednotlivých oddílů. U AD je typický menší průtok v oblasti temenní mozkové kůry.<sup>3</sup>

Obr. č. 6 SPECT zobrazení mozku



### 3.1.3 Neurobiologické změny

V průběhu normálního stárnutí klesá hmotnost i objem mozku, pokles se projevuje zejména po 55. roce života. S věkem se rovněž snižuje tloušťka mozkové kůry a po 60. roce věku se rozšiřují mozkové komory. V průběhu AD probíhají podobné změny jako při normálním stárnutí. Změny jsou podstatně nápadnější u presenilní formy AD. Numerická atrofie neuronů v průběhu AD převyšuje numerickou atrofii u normálního stárnutí o 40-80 %. Nejpostiženější je spánkový lalok. Není přesně známo, proč neurony při AD zanikají, možným důvodem apoptózy (buněčné smrti) neuronů je ukládání  $\beta$ -amyloidu, dalším možným důvodem je oxidativní stres.<sup>4</sup>

#### 3.1.3.1 SENILNÍ PLAKY

Důležitou roli při AD hraje extracelulární ukládání degenerativního proteinu  $\beta$ -amyloidu.

Tento protein vzniká z bílkoviny tělu vlastní, z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je obsažen v neuronech. Za normálních podmínek je APP štěpen na krátké rozpustné částice  $\alpha$ - a  $\beta$ - sekretasou. Za patologických podmínek se uplatňuje  $\gamma$ -sekretasa, štěpící delší fragmenty, které mají tendenci ke koagulaci a tak dochází k tvorbě  $\beta$ -amyloidu. Shluky  $\beta$ -amyloidu tvoří základ senilních tzv.

Alzheimerovských plaků. V placích dochází okolo drúz amyloidu k odumírání neuronů. Jsou aktivovány gliové buňky, které začnou produkovat cytokiny, reaktivní formy kyslíku (ROS) a další látky akutní zánětlivé fáze. Dochází k aktivaci enzymu cyklooxygenasy II a tím ke zvýšené tvorbě prostaglandinů. Uvolněné zánětlivé reaktanty vedou k dalšímu poškození neuronů. ROS způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a rovněž tak poškozují neurony. Při neuronálním poškození dochází k uvolnění excitačních aminokyselin (glutamátu, aspartátu) a po jejich vazbě na příslušné receptory k nadměrnému vstupu kalcia do neuronů. Metabolické intraneuronální změny, které následují, vedou k apoptóze.<sup>4</sup>

Senilní plaky se dají zobrazit řadou metod, v současnosti se různými druhy barvení dá rozlišit celkem osm typů senilních plaků a patogeneticky blízkých struktur. Počet senilních plaků vztažený na plošnou jednotku mozkové kůry je jedním z kritérií definitivní, tj. histologické diagnózy AD.<sup>4</sup>

#### 3.1.3.2 *TAU-PROTEIN, NEURONÁLNÍ KLUBKA*

Neuronální klubka, tangles, jsou synonymem pojmu Alzheimerovy změny neorofibril. V mikroskopu se jeví jako párová spirální vlákna a jejich podstatnou součástí je tau-protein. Tento protein, spjatý s neuronálními mikrotubuly, degeneruje odštěpením krajních aminokyselin, látka pak vytváří filamenta, která jsou základem neuronálních klubek.<sup>4</sup>

#### 3.1.3.3 *APOLIPOPROTEIN E*

Apolipoprotein E (ApoE) je protein, který se podílí na redistribuci lipidů mezi buňkami jednotlivých orgánů i mezi buňkami téhož orgánu. Gen pro ApoE se vyskytuje ve třech podobách, které kódují vznik tří různých izoform ApoE2, ApoE3, ApoE4. Nejčastější z nich je ApoE3 (asi 78 % populace, ApoE4 se objevuje asi u 17% lidí), u zbylé části populace se nalézá ApoE2. Nosičství alely ApoE4 je významným rizikovým faktorem vzniku AD.<sup>4</sup>

#### 3.1.3.4 OXIDATIVNÍ STRES

V patogenezi se může uplatňovat oxidativní stres a ROS. To jsou atomy nebo molekuly, které jsou vedlejším produktem oxidačních reakcí a jsou nositeli nepárového elektronu. Některé ROS jsou vysoce reaktivní a mohou poškodit DNA, buněčné proteiny, lipidy membrán.<sup>4</sup>

#### 3.1.3.5 ZMĚNY NEUROTRANSMITEROVÝCH SYSTÉMŮ

Z neurotransmitterových systémů je nejvíce postižen systém acetylcholinergní. Typicky je postižena presynaptická oblast, je snížena aktivita enzymu syntetizujícího acetylcholin (cholinacetyltransferasa), je snížen vstup prekurzorů (cholin, acetylkoenzym A), zpětné vychytávání acetylcholinu i jeho uvolnění z presynaptického zakončení. Z dalších systémů je postižen serotoninergní, je snížena hladina somatostatinu. S věkem klesá i syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace monoaminoxidasami (MAO). Zvláště stoupá aktivita MAO typu B, jak s věkem, tak výrazněji u AD.<sup>4</sup>

### 3.1.4 Příčiny AD

Příčiny AD zůstávají dosud neobjasněny, předpokládá se vliv řady faktorů, které mohou onemocnění navodit nebo k němu přispívat ve vzájemné součinnosti:

- Genetické faktory
- Zánětlivé faktory, porucha imunitního systému
- Neúplná nebo nekonvenční virová infekce
- Environmentální faktory, např. neurotoxický vliv některých chemických látek<sup>4</sup>

### 3.1.5 Rizikové faktory AD

- Věk – výskyt AD před 60. rokem je vzácný. S přibývajícím věkem strmě stoupá. Není však zřejmé, jestli rizikovým faktorem je sám věk, nebo fakt, že se ve

vyšším věku může přidávat působení dalších vlivů. Někdy se říká, že AD je vlastně nepřírozeně urychlené stárnutí mozku.

- Ženské pohlaví – ženy jsou AD postiženy častěji než muži. U mužů je naopak častější demence cévního typu.
- Nízká úroveň vzdělání a nízká duševní aktivita. Učení vyžaduje zvýšení aktivity mozku. Tím se náš mozek vyvíjí a je odolnější. Učení povzbuzuje vytváření nových spojů v našem mozku. Činnost otupující naše myšlení a vnímání zaměstnává jen malé části našeho mozku. Při jejím dlouhodobém provádění se může stát, že se nepoužívané oblasti začnou zmenšovat.
- Apolipoprotein E – ApoE4 může zvyšovat riziko AD.<sup>4</sup>
- Rodinná anamnéza – dědičnost AD je stále předmětem výzkumu. Přími pokrevní příbuzní jsou postiženi 4 krát častěji než všeobecná populace. Z řady dosud provedených genetických studií vyplývá, že o dědičnosti rozhoduje více než jeden genetický faktor. AD je spojena s abnormalitami na chromozomech 21, 19, 14, 1 a pravděpodobně i 12.<sup>2</sup>
- Úrazy hlavy – těžší nebo opakované úrazy hlavy mohou zvýšit pravděpodobnost rozvoje demence. Známý je častější výskyt demence u sportovců, kteří utrpěli vícekrát úraz hlavy s bezvědomím – hlavně boxeři.
- Vysoký krevní tlak, vysoké hladiny lipidů a diabetes mellitus – v posledních letech se zjišťuje, že tyto nemoci, zvláště pokud nejsou řádně léčeny, jsou rizikovými faktory nejen pro srdeční infarkt a mozkovou mrtvici, ale pro rozvoj demence cévního typu i AD.
- Kouření a nezdravý životní styl.<sup>4</sup>

### **3.2 TERAPIE AD**

V současnosti není zcela známa etiopatogeneze AD a není tedy možná kauzální léčba.

Terapie AD je komplexní, zahrnuje farmakoterapii, psychoterapii a socioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci a spolupráci s rodinou a pečovateli nemocného.<sup>2</sup>

Při léčbě začínající AD jsou dnes k dispozici některé léky, které mohou v rané a střední fázi nemoci zlepšit kvalitu života. Snášlivost těchto léků je však u každého pacienta různá a stejně tak i jejich účinky. Pozitivní účinky léků tohoto druhu se projeví v průměru u každého třetího pacienta, přičemž dosud není možné předpovědět, který lék bude u kterého pacienta účinkovat a kdy se mohou objevit vedlejší účinky. Některé léky mohou dokonce v jednotlivých případech způsobit místo zlepšení zhoršení stavu. Ošetřující lékaři musí proto účinky a vedlejší účinky velmi pečlivě a pravidelně sledovat.<sup>1</sup>

### **3.2.1 Kognitivní farmakoterapie AD**

#### **3.2.1.1 *SUBSTITUTE NEDOSTATKOVÝMI NEUROTRANSMITERY NEBO NEUROMODULÁTORY***

U AD je nejvíce postižen acetylcholinergní systém, zejména oblast presynaptická, zatímco oblast postsynaptická zůstává poměrně intaktní. Látky, které se používají pro zlepšení funkce centrálního acetylcholinergního systému se obvykle označují jako kognitiva.

##### **a) Substitute prekursorů acetylcholinu**

Substitute samotným acetylcholinem není možná pro jeho příliš krátký poločas.<sup>2</sup> Cholin je získáván z potravy. ACh uvolněný z neuronů je rozkládán na cholin a kyselinu octovou. Asi 50 % takto uvolněného cholinu je znovu využito k syntéze ACh cholinacetyltransferasou (ChAT). Nemá-li neuron dostatek cholinu, může ho získat hydrolýzou membránových fosfolipidů, což může vést k degradaci cholinergních neuronů. Zpětné vychytávání cholinu ze synaptické štěrby je považováno za krok, který určuje rychlost tvorby nového ACh. Na zpětném vychytávání cholinu se podílí high affinity choline transporter (CHT1). Sloučeniny stimulující jeho aktivitu se označují HACU (high affinity cholin uptake enhancers). Příznivý účinek podávání cholinu a lecitinu pro léčbu AD nebyl v klinických studiích potvrzen.<sup>5</sup> Cholin se nepoužívá, protože může působit depresogenně. Používají se proto různé formy lecitinu, především sojový lecitin. Z lecitinu se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu. Lepších výsledků je dosaženo kombinovanou terapií lecitinu s inhibitory acetylcholiesteras než v monoterapii lecitinem.<sup>2</sup> Lepších

výsledků bylo dosaženo s některými jinými prekurzory ACh (cholin-alfoscerát, citikolin), ale k potvrzení výsledků je ještě třeba provést a vyhodnotit rozsáhlé a dobře kontrolované klinické pokusy.<sup>5</sup>

#### b) Použití inhibitorů acetylcholinesterasy

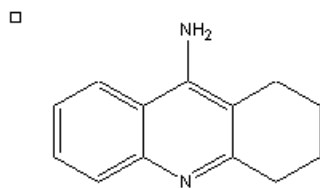
Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym, který odbourává acetylcholin v CNS. Na periférii převládá butyrylcholinesterasa (BuChE). Zablokováním tohoto odbourávajícího enzymu zvýšíme množství acetylcholinu schopného vazby na své receptory.<sup>6</sup> Důležité je, aby tyto látky specificky blokovaly mozkovou AChE bez ovlivnění její periferní formy (to by mohlo vést k řadě nežádoucích účinků, jako např. svalové křeče, nauzea, pocity slabosti, průjem, pocení, tachyarytmie).<sup>2</sup>

Obě formy cholinesteras jsou rozlišeny geneticky, strukturně a také reakční kinetikou. Butyrylcholin není fyziologickým substrátem v savčím mozku a role BuChE je dosud obtížně interpretovatelná. V lidském mozku se BuChE nachází v neuronech, gliových buňkách, stejně tak jako v neuritovém plaku a tangles u pacientů s AD. Zatímco acetylcholinová aktivita snižuje progresivitu AD v mozku nemocných pacientů, BuChE aktivita může zvýšit progresivitu, záleží však na dalších faktorech. Na základě různých modelů (a u pacientů s pokročilou AD) se však zdá, že BuChE může určitou měrou nahradit AChE při hydrolýze mozkového acetylcholinu.<sup>7</sup> BuChE se ukázala skutečně novým cílem v terapii AD. AChE je predominantní ve zdravém mozku, BuChE hraje patrně určitou minoritní roli v regulaci hladiny mozkového acetylcholinu. V případě mozku s AD se aktivita BuChE progresivně zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna, resp. se snižuje.<sup>8</sup>

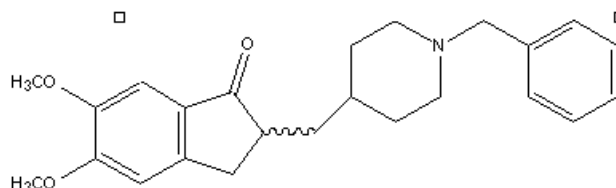
Inhibitory acetylcholinesterasy různé struktury jsou významnými látkami pro ovlivňování demence Alzheimerova typu. Nové inhibitory AChE mohou přinést poznání ke struktuře těchto léčiv nového typu a usnadnit tak poznání interakce mezi inhibitory a enzymem. V současnosti je spektrum klinicky použitelných látek relativně úzké:<sup>9,10</sup>

- Karbamáty – rivastigmin (Exelon®)
- Piperidinové deriváty – donepezil (Aricept®)
- Alkaloidy – galanthamin (Reminyl®)

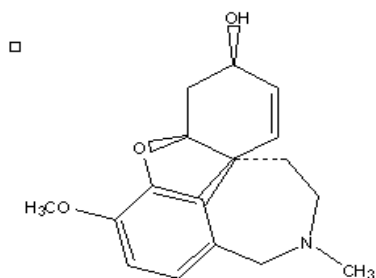




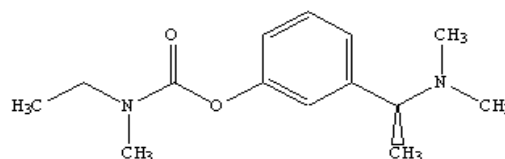
Takrin



Donepezil



Galanthamin



Rivastigmin

Takrin (akridinové deriváty, Cognex®) se díky svým vedlejším účinkům v současné době nepoužívá.

Mezi nové AChEI patří 7-methoxytakrin, huperzin A, bis(7)takrin, bis-huperzin A, huprin X, huprin Y, huprin Z, lipokrin, ganstigmin, ladostigil.<sup>5</sup>

#### c) Použití agonistů muskarinových i nikotinových acetylcholinergních receptorů

Bylo zjištěno, že příznivý efekt mají agonisté muskarinových M1 a M3 receptorů.<sup>2</sup> Ideální sloučenina by měla stimulovat postsynaptické M1-receptory a inhibovat presynaptické M2-receptory. Pokusy s klasickými agonisty muskarinových receptorů (arekolin, pilokarpin, oxotremorin) nebyly úspěšné. Výzkum této skupiny stále pokračuje, protože se předpokládá, že M1-agonisté regulují procesy vedoucí k rozvoji AD. Navíc mají účinky podobné některým neuroleptikům.<sup>5</sup> Látky, které působí agonisticky na M2-receptorech, kognitivní buňky poškozují.<sup>2</sup> Intenzivně je zkoušen xanomelin, milamelin (Ebixa®), alvamelin. Xanomelin se váže nejen na vazebné místo pro ACh, ale také allostericky. Má totiž v molekule delší postranní řetězec, který se podílí na allosterické vazbě. Analogy s kratším řetězcem než butyl se allostericky nevážou. Dále jsou pak zkoušeny látky aceklidin, talsaklidin, WAY-132983. V druhé fázi klinického zkoušení jsou látky CI-1017 a RU 47213.<sup>5</sup>

Vývoj antagonistů M2-receptorů nebyl zatím úspěšný. Sloučeniny jsou málo selektivní, špatně pronikají přes hematoencefalickou bariéru a mohou zvyšovat tepovou frekvenci. Prototypy v této skupině jsou BIBN-99 a SCH-57790 a jeho analoga.<sup>5</sup>

Jako agonisté nikotinových receptorů jsou zkoušeny exogenní ligandy jako nikotin, ABT-418, ABT-089, epibatidin, SIB-1553A, nefiracetam, AR-R17779, GTS-21. Dále se pak zkoušejí i allostericky potencující ligandy (APLs), které zvyšují aktivaci receptoru agonistou. Vazebné místo pro tyto sloučeniny leží na alfa podjednotce nikotinového receptoru. Jejich prototypem je galanthamin. Dalšími APLs jsou např. kodein, fysostigmin, serotonin. Většina známých APLs má v molekule dusík, který je při fyziologickém pH kvarternizovaný a nachází se v určité vzdálenosti od fenolické skupiny.<sup>5</sup>

d) Ovlivnění acetylcholinergního systému prostřednictvím jiných neurotransmiterových systémů

Acetylcholinergní systém je pod vlivem tonické inhibice GABAergního systému. Hledají se proto látky, které by parciálně inhibovaly GABA-A receptory tak, aby se odblokovala pouze tato tonická inhibice. Zkoušejí se látky ze skupiny  $\beta$ -karbolinů např. gedokarnil.<sup>2</sup>

e) Další látky ovlivňující acetylcholinergní systém

- Indeloxazin – stimuluje uvolnění acetylcholinu z presynaptického zakončení.
- Nicergolin – nootropikum, působí jako vasodilatans (Ergotop®).
- Acetyl-L-karnitin – zlepšuje příjem prekurzorů pro syntézu acetylcholinu do neuronů.<sup>2</sup>
- Linopirdin, DMP-543, deriváty 4-aminopyridinu - modulátory iontových kanálů.<sup>5</sup>

### 3.2.1.2 OVLIVNĚNÍ NEURONÁLNÍHO METABOLISMU

U pacientů s AD bývá popisován snížený neuronální metabolismus, zejména oxidativní metabolismus glukózy a buněčná proteosyntéza.

Proto se u pacientů s touto diagnózou užívají nootropní látky, v širším slova smyslu stimulancia mozkového metabolismu (cerebral metabolic enhancers). Nootropika zvyšují utilizaci glukózy, zvyšují oxidativní metabolismus, některá z nich mohou zlepšovat plasticitu erytrocytů, působit jako lapače ROS. Často jsou součástí kombinované terapie demencí.<sup>2</sup>

- Piracetam (Geratam®, Piracetam®)
- Pyritinol (Enerbol®, Encepharbol®)
- Nicergolin (Ergotop®)
- Meklofenoxát
- Extractum ginkgo bilobae (Gingio®)
- Dihydroergotoxin (Secatoxin forte®)

### 3.2.1.3 SCAVENGERY ROS

V patogenezi AD hraje roli působení ROS, což jsou velmi reaktivní formy molekul různých látek, mezi nejreaktivnější ROS patří singletový kyslík, hydroxylový ion, superoxid, oxid dusnatý. V organismu zastávají fyziologické funkce, především úlohu informativní, jejich množství však musí být regulováno. Odstraňovány jsou pomocí enzymů superoxidodismutasy, katalasy a glutathionperoxidasy. Za patologických podmínek vzniká více ROS než jsou schopny příslušné enzymy zpracovat a radikály poškozují řadu jiných enzymů, způsobují peroxidaci lipidů neuronální membrány a pravděpodobně se podílejí na spuštění aterogeneze. K likvidaci nadměrného množství ROS se používají tzv. scavengery (lapači, zametači) ROS, jedná se o látky tělu vlastní, ale i o látky dodávané potravou či léky.<sup>2</sup>

- $\alpha$ -Tokoferol
- Kyselina askorbová
- Retinol
- Melatonin
- Pyritinol
- Extractum ginkgo bilobae
- Lazaroidy
- Selegilin
- Selen
- Silymarin

- Lykopen

#### 3.2.1.4 OVLIVNĚNÍ EXCITOTOXICITY

Aspartát a glutamát jsou excitační aminokyseliny, působící v mozku jako neuromediátory, jsou nutné v procesu učení a paměti. Nadměrné působení těchto aminokyselin především na NMDA-receptory vede ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů, které vede k destabilizaci vnitřního prostředí a následné smrti neuronu. Hledají se proto látky, které blokují NMDA-receptory. Pravděpodobně takto působí některé látky obsažené v extraktu z *Ginkgo biloba*, selegilin, memantin a cykloserin.<sup>2</sup>

#### 3.2.1.5 NERVOVÉ RŮSTOVÉ FAKTORY

Nervové růstové faktory jsou produkovány nervovým systémem, jsou důležité pro plasticitu neuronů, stimulují jejich růst (u plodu). Používá se preparát Cerebrolysin, což je peptidový preparát z mozků prasat. Podporuje funkci nervových buněk, ovlivňuje neuronální plasticitu, zvyšuje penetraci glukózy do mozkové tkáně, ovlivňuje porušený oxidativní metabolismus v mozku.

Předpokládá se, že stimulace některých nikotinových receptorů vede k uvolnění nervových růstových faktorů, podobně jako stimulace trk-receptorů (receptory spojené s aktivací tyroxinkinasy). Jako stimulator uvolnění nervových růstových faktorů působí i selegilin.<sup>2</sup>

#### 3.2.1.6 PROTIZÁNĚTLIVÉ LÁTKY, ESTROGENY, STATINY

U AD dochází k projevům zánětlivé reakce, která přispívá k zániku neuronů. Podávání protizánětlivých látek, které procházejí hematoencefalickou bariérou, pravděpodobně působí jako preventivní faktor.

Řada údajů dokládá důležitou úlohu estrogenů v procesu stárnutí, estrogeny byly považovány za protektivní faktor ke snížení rizika AD u žen, ale pozdější studie tuto protektivní roli neprokázaly.

Statiny snižují krevní hladinu cholesterolu a jiných lipidů. Poslední studie prokázaly příznivý vliv u všech forem demence. Statiny pravděpodobně mohou významně redukovat riziko rozvoje AD.<sup>2</sup>

### 3.2.2 Nekognitivní farmakoterapie AD

Tato terapie zahrnuje léčbu přidružených, nekognitivních symptomů AD.

Nejčastěji se jedná o léčbu poruch spánku. Klasická hypnotika používáme co nejméně, protože obvykle nepříznivě ovlivňují kognitivní funkce. Dává se přednost nebenzodiazepinovým hypnotikům jako je např. zolpidem či zopiklon. U pacientů s neklidem a delirantními stavy je možné použít jako hypnotika látky ze skupiny neuroleptik, dobře tolerován je tiaprid, melperon a risperidon.

Depresivní a úzkostné stavy u pacientů s demencí léčíme nejčastěji pomocí selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (fluoxetin, fluvoxamin, citalopram), rovněž je možno podávat inhibitory monoaminoxidáz (moklobenid, selegilin). Klasická antidepresiva I. generace nepoužíváme pro jejich anticholinergní nežádoucí účinky.

U AD se často vyskytují stavy psychomotorického neklidu, pacienti mohou být agresivní, mohou se u nich vyskytovat halucinace a bludy. Ke zvládnutí těchto situací lze použít stejná neuroleptika jako u poruch spánku, ale ve vyšších dávkách, s podáním několikrát denně.<sup>2</sup>

### 3.3 INHIBITORY AChE – PŘÍRODNÍ LÁTKY

V tradiční medicínské praxi se používá mnoho rostlin k léčbě kognitivních poruch, zahrnující neurodegenerativní onemocnění jako AD a další jiné poruchy paměti. V současnosti se provádí farmakologický výzkum mnoha přírodních zdrojů, které mají vést k identifikaci potenciálních nových léčiv, zahrnujících právě ty k léčbě poruch paměti. Je mnoho léků přístupných v západní medicíně, které byly izolovány z rostlin. Například některé alkaloidy z přírodních zdrojů byly zkoumány pro jejich vlastnosti při AD a nyní jsou v klinickém užití (galanthamin). Různé další čeledi se ukázaly přínosné při AD nebo farmakologické aktivity naznačují potenciál pro jejich užití v léčbě AD.<sup>11</sup>

Velmi významnou roli hraje studium přírodních látek, protože struktura těchto poměrně složitých molekul významně modifikuje účinek nejen ve smyslu vlastního efektu, ale především vedlejších účinků.

### 3.3.1 Ovlivnění osudu ACh a AChE

#### 3.3.1.1 M2-ANTAGONISTÉ

Himbacin (*Galbulimima baccata*, Himantandraceae)

#### 3.3.1.2 LÁTKY JINÉHO PŮSOBENÍ

N – Acetyl – L – karnitin

#### 3.3.1.3 INHIBITORY ACHE

- Galanthamin (*Galanthus woronovii*, Amaryllidaceae)
- Salignenamid C (*Sarcococca saligna*, Buxaceae)
- Zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, *Zea mays*, Poaceae)
- Dekursinol (*Angelica gigas*, Apiaceae)
- Ursolová kyselina (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, Lamiaceae, Ericaceae)
- Arisugacin A, (Penicillium sp.)
- Arisugacin B (Penicillium sp.)
- Cyklofostin (Penicillium WK-4164 e FO-4259)
- Dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae)
- (+)-Homomoenjodaramin, moenjodaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae)
- Cykloprotobuxin C, Cyklovirobuxein A, Cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae)
- $\alpha$ -Onocerin (*Ononis spinosa*, Fabaceae)
- $\alpha$ -Viniferin (*Caragana chamlague*, Fabaceae) Cynatrosidy A, B, C (*Cynanchum atratum*, Ranunculaceae)<sup>12</sup>

U některých přírodních látek byla pozorována spřažená aktivita: inhibují jak AChE tak BuChE.<sup>13,14</sup> Při syntéze nových léčiv tohoto typu je velmi zásadní stereochemie: terapeuticky významně aktivní jsou pouze některé stereoizomery<sup>15</sup> (a tento stav se uplatňuje i z hlediska ovlivnění AChE a BuChE, jak je to vidět např. u stereoizomerů

huperzinu A<sup>14</sup>). Tento faktor musí být významně zohledněn, protože jinak dochází v řadě případů k výraznému vzestupu nežádoucích účinků.

Jedna z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE, je také vlaštovičník větší, *Chelidonium majus* L. Jeho výzkum se v poslední době poměrně rozšiřuje z důvodu antineoplastického účinku alkaloidního přípravku nazývaného Ukrain (preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou),<sup>16</sup> díky efektu benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty<sup>17</sup> a díky inhibici 5 a 12 lipoxygenasy neredoxním mechanismem<sup>18</sup> a dalších účinků.

### **3.3.2 Inhibitory ACAT**

Pyripyropen A (*Aspergillus fumigatus*)

### **3.3.3 Ovlivnění produkce amyloidu**

Tanshinon I (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae)

### **3.3.4 Neuroprotektiva**

Ginkgolid B (BN-520121, *Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae)

### **3.3.5 Inhibitory prolylendopeptidasy**

Fenanthrenové deriváty (*Salvia deserta*, Lamiaceae)<sup>12</sup>

### 3.4 *Chelidonium majus* L.

#### 3.4.1 Botanický popis

Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus*) je 30 – 50 (70) cm vysoká rostlina, roztroušeně chlupatá, s tlustou a krátkou kořenovou hlavou s četnými kořeny. V celé rostlině jsou článkované mléčnice s oranžovou šťávou. Lodyha je přímá, oblá, dutá a rozvětvená. Listy jsou střídavé, bez palistů, dolní řapíkaté a horní přisedlé, s chobotnatě peřenodílnou až lichozpeřenou, svrchně temně, ve spodní části sivozelenou čepelí, s křídlatým větvením. Úkrojky (lístky) jsou nesouměrné, chobotnatě vroubkované až zastříhávané. Květenstvím je chudokvětý okolík. Květy jsou obojaké, dvoučetné, dlouze stopkaté, s volnými obaly. Kališní lístky jsou dva, světle žluté, záhy opadavé a korunní 2+2, široce vejčité, vzadu dřípáté, sytě žluté. Tyčinky jsou četné a žluté. Semeník je svrchní, ze dvou plodolistů, jednopouzdrý, čárkovitý a se dvěmi nástěnnými semeníky. Plodem je lysá, šešuli podobná tobolka, pukající od stopky dvěma chlopněmi. Semena jsou vejcovitá, černá, se sítnatě dolíčkátým osemením a bílým masitým výrůstkem.<sup>19</sup>

#### 3.4.2 Systematika

*Chelidonium majus* je rostlinný druh z čeledi mákovitých (Papaveraceae).

V rodu *Chelidonium majus* L. existují různé morfologické variety:

-var. *crenatum*

-var. *fumariifolium*

-var. *maius*

-var. *tenuifolium*

Existují různé karyotypy:  $2n = 12$ , jedná se o rostliny mnoha stanovišť v Evropě a Asii;  $2n = 10$ , rostoucí v Japonsku a východní Evropě;  $2n = 20$ , rostoucí v Japonsku; v Polsku existuje tetraploidní vyšlechtěná odrůda  $2n = 24$ . Je zde pěstována a označována jako *Chelidonium majus* „Cynober.“<sup>20</sup>



### 3.4.3 Obsahové látky

Hlavními obsahovými látkami vlašovičníku jsou alkaloidy. V rostlině jich bylo popsáno již více než třicet. Za zmínku stojí, že z tohoto počtu jich 15 poprvé izoloval a převážně určil Slavík. S výjimkou sparteinu patří popsané alkaloidy k derivátům izochinolinu. Řadí se k 8 strukturním typům, jejichž přehled uvádí tab.1.

Tab. č.1 Přehled alkaloidů z *Chelidonium majus*

Alkaloid		Kořen	Nadzemní část
<b>Kvartérní benzo[c]fenanthridiny</b>	Sanguinarin	+++	+++
	Chelerythrin	+++	+++
	Chelirubin	+	+
	Chelilutin	+	+
	Makarpin	+	+
<b>Terciární benzo[c]fenanthridiny</b>	Chelidonin	++	+++
	Homochelidonin	+++	+
	Chelamin	+	-
	Chelamidin	+	-
	Dihydrosanguinarin	+	+
	Dihydrochelerythrin	+	+
	Dihydrochelirubin	+	-
	Dihydrochelilutin	+	-
	N-Demethyl-9,10,- dihydrooxysanguinarin	+	-
	Chelidimerin	?	?
	Norchelidonin	+	+
	Izochelidonin	-	+
	Oxysanguinarin	+	-
	Methoxychelidonin	-	-
<b>Terciární protoberberiny</b>	Stylopin	++	++ až +++
<b>Kvartérní protoberberiny</b>	Methylstylopinium	+	+
	Berberin	++	+++
	Koptisin	+++	+++
	Korysamin	+	+
<b>Protopiny</b>	Protopin	++	+
	Allokryptopin	++	+
<b>Kvartérní aporfiny</b>	Magnoflorin	+++	-
	Turkiyenin	+	+
	Sparteín	?	?

Je známo, že distribuce alkaloidů v rostlině je nerovnoměrná, mění se v průběhu vegetace, v závislosti na klimatických podmínkách a stáří rostliny.<sup>16</sup> Sušené nadzemní a podzemní části sbírané v Jugoslávii v různých ročních obdobích vykazují podle vegetační periody různé obsahy alkaloidů. Během kvetení (duben, květen) vykazuje rostlina nejnižší počet alkaloidů, nať asi 0,5 % a kořen asi 0,8 %. V létě (červenec, srpen) byly dosaženy nejvyšší hodnoty, nať asi 1,7 % a kořen asi 2,2 %. Na podzim (říjen, listopad) klesá opět obsah alkaloidů. Jako nejvýhodnější doba sklizně se udává od začátku srpna do konce října.<sup>20</sup>

Nejbohatším orgánem je kořen, obsah alkaloidů v něm často dosahuje až 2-3 %. U víceletých rostlin je obsah alkaloidů v kořeni výrazně vyšší než v prvním roce vegetace. Hlavními alkaloidy kořene jsou koptisin a chelidonin, významný je i obsah sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a kvartérního aporfinového alkaloidu magnoflorinu.

V nadzemních částech rostliny je zastoupení alkaloidů nižší (0,5-1,5 %) a podléhá v průběhu vegetace významným kvalitativním změnám. Jako hlavní alkaloidy jsou uváděny chelidonin, koptisin, stylopin, sanguinarin a chelerythrin. Hlavním alkaloidem je po celé vegetační období koptisin. Jeho obsah v nadzemních částech činil 0,4-0,8 %. Na počátku vegetačního období byl jako druhý hlavní alkaloid nadzemní části stanoven stylopin, přičemž obsah chelidoninu, sanguinarinu a chelerythrinu byl v této době relativně nízký. Po odkvětu rostliny však obsah tří posledně jmenovaných alkaloidů narůstal a ke konci vegetace již patřily k hlavním, zatímco obsah stylopinu výrazně poklesl.<sup>16</sup>

Výzkumy mléčné šťávy získané z lodyhy *Chelidonium majus* ukázaly, že čerstvá, ještě nezoxidovaná mléčná šťáva obsahuje větší množství dihydrokoptisinu, sanguinarinu, chelerythrinu, berberinu a koptisinu. Pokud necháme mléčnou šťávu stát několik dní na vzduchu dochází k oxidaci a už nelze dokázat žádný dihydrokoptisin, pouze koptisin. Lze předpokládat, že v čerstvém nezoxidovaném latexu se vyskytují i jiné, lehce oxidovatelné alkaloidy jako např. dihydroberberin. K oxidaci dochází i při zpracovávání rostliny, např. při sušení.

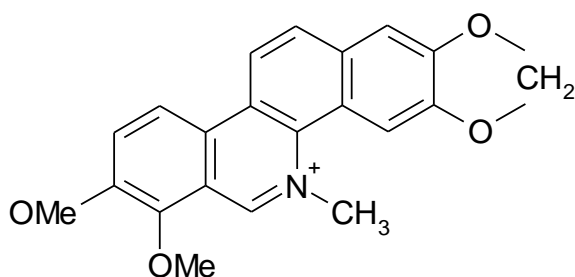
Zajímavé se zdá být i rozdělení obsahových látek čerstvého vlašovičnickového latexu. Všechny 5 prozkoumaných alkaloidů (berberin, chelerythrin, koptisin, dihydrokoptisin a sanguinarin) jsou obsaženy ve vakuolách spolu s chelidonovou kyselinou a enzymy jako hydrolasy. Sanguinarin a chelerythrin mají přitom větší

afinitu k vakuolovému obsahu než berberin, koptisin a dihydrokoptisin mohou být z vakuol uvolněny do mléčné šťávy až naposled.<sup>20</sup>

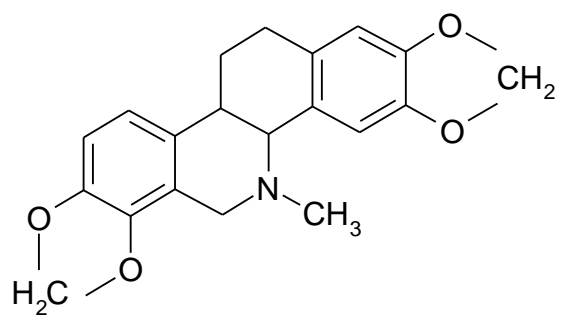
Enzym phenoloxidasa je obsažen v mléčné šťávě. Přítomnost enzymů v rostlině, získávaných společně s aktivními účinnými látkami, je možná základem pro dříve popisované nejisté působení preparátu vlaštovičníku. Přítomnost enzymů může vést k přeměnám či vzniku aktivních účinných látek. Dnes se upřednostňuje použití vysušené drogy, přičemž obsah alkaloidů může kolísat dle podmínek sušení. Zahřátí přes 100 °C inaktivuje enzymy odbourávající alkaloidy.<sup>20</sup>

Plody obsahují chelidonin a stylopin. V semenech převažuje koptisin.<sup>20</sup>

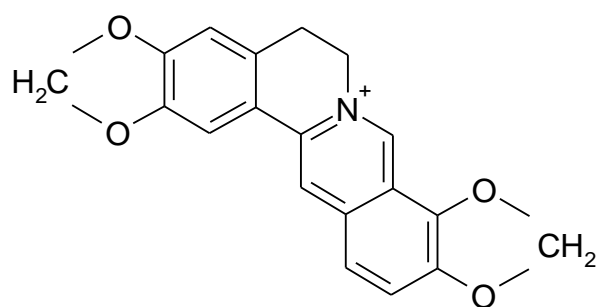
Nealkaloidním sekundárním metabolitům byla dosud ve srovnání s alkaloidy věnována menší pozornost. Dřívější práce uvádějí přítomnost alkoholu chelidonolu, kyselin chelidonové, kávové, ferulové a kumarové, dale vysoký obsah karotenů a kyseliny askorbové, flavonoidů rutinu a kvercetin. Z minoritních složek byly prokázány blíže nespecifikované triterpenoidy, silice a saponiny, kyselina nikotinová, cholin, methylamin, histamin, tyramin. Z nadzemních částí rostlin byly izolovány estery kyseliny kávové: 2-kaffeoylglycerová, 2-kaffeoylthreová, 2-kaffeoyljablečná a ester kávové kyseliny s 1,4-laktonem kyseliny threonové.<sup>16</sup>



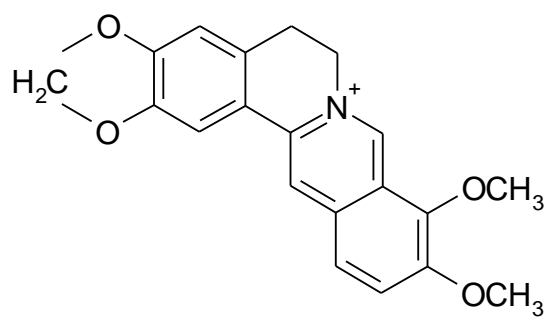
Chelerythrin



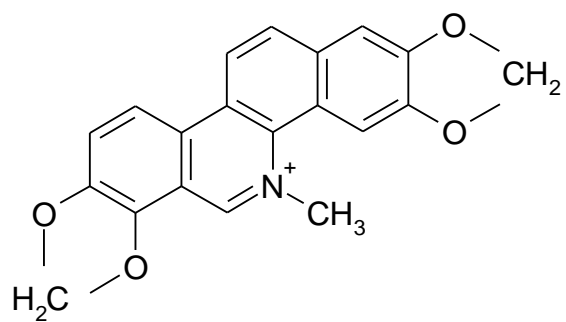
Chelidonium



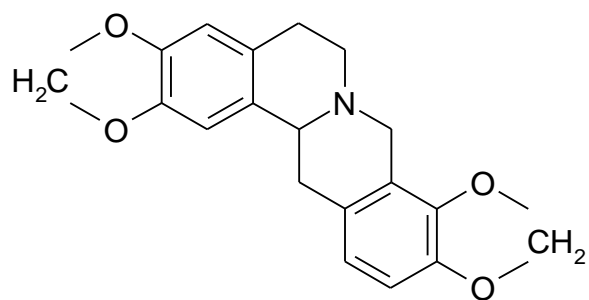
Berberin



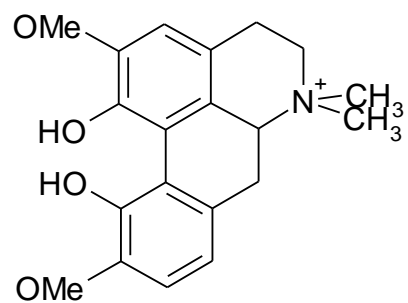
Koptisin



Sanguinarin



Stylopin



Magnoflorin

### 3.4.4 Farmakologické účinky, využití rostliny v praxi

Využití rostliny má bohatou historii v lidovém léčitelství. Není téměř choroby, proti které vlaštovičník v průběhu staletí nebyl použit. Léčivá moc jí byla přisuzována již za starověku a od té doby byla v léčitelství hojně používána. Byla doporučována proti chorobám jater, zimnici a vodnatelnosti, na zlepšení zraku, k odstraňování bradavic i k léčbě tumorů. V lidové medicíně se traduje použití při kožních potížích jako jsou puchýřkaté vyrážky, svrab a bradavice. Také se doporučuje při zánětech žlučového měchýře, žlučových kamencích, zánětu zažívacího traktu a řadě dalších často velmi závažných onemocnění, nicméně tato doporučení nejsou dosud doložena odbornými studiemi.<sup>16</sup>

V novější době je vlaštovičník užíván ve fytoterapii jako droga s účinkem spasmolytickým, analgetickým, cholagogním, popř. jako dermatologikum, antihistaminikum a antiseptikum.

Extrakty z vlaštovičníku jsou součástí řady galenik, produkováných zejména v západní Evropě. Jsou indikovány při hepatopatiích, poruchách funkce žlučníku a po jeho operacích. V Číně se extrakty z *Chelidonium majus* užívají při léčbě chronické bronchitidy, dávivého kašle a jako analgetikum. Vlaštovičník je též součástí řady homeopatik.<sup>16</sup>

Uvádí se, že čerstvá rostlina je jedovatá, na kůži a sliznicích vyvolává záněty, otoky až puchýře, vnitřně zvracení, krvavé průjmy a hematurii. Na toxicitě čerstvé šťávy se dle některých údajů podílí blíže nespecifikovaná pryskyřičnatá látka, která se sušením rozkládá a ztrácí účinnost. Toxicita sušené drogy je podstatně nižší, dle některých údajů je již netoxická. V praxi jsou otravy touto rostlinou řídce pro její nepříjemnou chuť a vůni.<sup>16</sup>

#### 3.4.4.1 PROTINÁDOROVÉ A ANTIVIROVÉ ÚČINKY

Klinické použití vlaštovičníku při léčbě nádorů se datuje již od minulého století. Botkin popsal dva případy karcinomu léčené extrakty z vlaštovičníku. Další klinické údaje z tohoto období popisují užití chelidoninsulfátu při rakovině žaludku, extraktu z vlaštovičníku při karcinomu prsu a dalších orgánů. Dále má droga dlouhou historii při léčbě bradavic, papilomů a kondylomat.<sup>16</sup>

Později při testování rostlinných extraktů na antitumorovou aktivitu byl pozorován inhibiční účinek extraktů z vlaštovičníku na sarkom 180 a Ehrlichův myší karcinom. K dokázání onkostatického působení vlaštovičnickových preparátů byly sepsány práce na základě experimentů na zvířatech s vodnými a alkoholickými extrakty ze sušené nati. Testovaným myším byl implantován tumor. Potom obdržely testované myši z každé řady extraktu denní dávku 50 mg extraktu na kg i. p. Osmý den byly testovaným a kontrolním myším nádory odstraněny a zváženy. Vodný extrakt ze sušené drogy nevykázal žádné signifikantní snížení ani u jednoho z tumorů. Methanolický extrakt ze sušené drogy vykázal sice snížení od 28 % do 30 % růstu tumoru, ale také zvýšenou toxicitu. Ve vodě rozpuštěný vyčištěný alkoholický extrakt neměl vyjádřenou žádnou toxicitu, snížení tumorového růstu se pohybovalo mezi 45 % až 48 %.<sup>20</sup>

V nedávné době opět vzrostl zájem o využití vlaštovičníku při terapii karcinomů, a to v souvislosti s přípravkem Ukrain, vyvinutým a patentovaným rakouskými autory. Tento preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou a vyznačuje se imunomodulační aktivitou. Působí zvýšení počtu T-lymfocytů a normalizaci poměru Th/Ts buněk, bez ovlivnění hladiny imunoglobulinů. Přípravek byl aplikován pacientům s různými typy karcinomů. Byl pacienty dobře snášen, navodil obnovení buněčné imunity, provázené objektivním zlepšením stavu pacientů a v několika případech i regresi tumorů. V *in vivo* studiích na myších tumorech bylo prokázáno, že intravenózní podání Ukrainu snižuje rychlost růstu tumoru. V pokusech *in vivo* bylo doloženo, že preparát obnovuje porušenou schopnost mikrofágů lytický štěpit tumorové buňky prostřednictvím stimulace LPS (lipopolysacharid, endotoxin). Obnovená cytolytická aktivita je nezávislá na TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), což naznačuje, že Ukrain aktivuje alternativní cytolytický mechanismus u mikrofágů. Studium dalších vlastností uvedeného přípravku je nadále věnována značná pozornost.<sup>16</sup>

V roce 1968 bylo v experimentech s tkáňovými kulturami zjištěno, že extrakty z rostliny vykazují slabou aktivitu proti viru Herpes simplex. Rovněž v pozdější práci byl potvrzen inhibiční efekt extraktu na virus Herpes simplex a některé adenoviry *in vitro*. Nejsilnější inhibiční účinek však vykazovala frakce neobsahující žádný z typických alkaloidů tohoto druhu. Aktivní složka extraktu nebyla definována.<sup>16</sup>



#### 3.4.4.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ A ANTIMYKOTICKÉ ÚČINKY

Ačkoliv je antimikrobiální působení u jednotlivých alkaloidů *Chelidonium majus* popisováno, je na toto téma provedeno jen minimum pokusů. Vysušený ethanolický extrakt ze sušené drogy ukazuje na agarovém kultivačním testu slabé antibakteriální působení proti *Staphylococcus aureus* 209, *Staphylococcus aureus* 617, *Escherichia coli* 12.835, *Escherichia coli* 2584 a *Shigella sonnei* 3c.<sup>20</sup>

Ethanolický tekutý extrakt ze sušené drogy ukazuje v agarovém difuzním testu od slabého do silného působení proti různým druhům jako např. *Candida*, *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermaphyten*.<sup>20</sup>

#### 3.4.4.3 HEPATOTROPNÍ A SPASMOLYTICKÉ ÚČINKY

Droga je stále v současných přehledech fytotherapie doporučována jako spasmolytikum, choleretikum a cholagogum, názory na její účinnost však nejsou jednoznačné. Údaje o pozitivních účincích drogy na sekreci žluče, aktivitu  $\alpha$ -amylázy i spazmy hladké svaloviny pochází vesměs ze starších prací. Významné je zvýšení sekrece bilirubinu, cholesterolu a zvýšení aktivity pankreatických enzymů lipázy a  $\alpha$ -amylázy po aplikaci 100 mg suchého extraktu z vlaštovičníku. Příznivé účinky preparátu Panchelidon obsahujícího extrakt z čerstvých rostlin s obsahem 20 % alkaloidů při léčbě chronické cholangitidy, cholelithiázy a diskinezií popsal v roce 1977 Neumann-Mangoldt.<sup>16</sup>

Preparát vykazoval spasmolytický a středně analgetický účinek, výrazně omezoval diarrhoeu, vyvolanou léčbou antibiotiky. Weiss hodnotí účinky vlaštovičníku jako nekonstantní. S odvoláním na vlastní zkušenosti uvádí, že účinnost drogy klesá delším uchováváním a je tedy nutné užívat extrakty vždy z čerstvé drogy. (Dle poznatků Masarykovy University se obsah alkaloidů v usušené droze uchováváním nemění, stejně jako se nemění alkaloidní složení tinktury uchovávané po několik měsíců v chladu). I při podávání čerstvé šťávy z vlaštovičníku však pozoroval, že zatímco v první polovině roku byl efekt jeho působení zřetelný a pacientům přinášel úlevu, po uplynutí této doby začal slábnout, až prakticky v krátké době zcela vymizel. Je pravděpodobné, že uvedené poznatky souvisí s nestandardním složením drogy.<sup>16</sup>

Větší uplatnění mezi galeniky používanými v současnosti v západoevropských zemích nacházejí směsné extrakty, obsahující vedle vlaštovičníku výtažky dalších drog. Např. preparát Chelidonium-Strath (Strath-Labor) obsahuje směs extraktů z *Herba chelidonii*, *Herba agrimoniae*, *Folium salviae* a *Herba hyperici*, přípravek Hepatofalk Planta (Falk) je směsí extraktů ze *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* a *Curcuma xanthorriza*. Preparát obdobného složení Aristochol (Steiner and Co.) byl hodnocen Baumanem, který uvádí, že přípravek zvyšuje choleresi, sekreci lipázy a amylázy. Pozitivní účinky preparátu Hepaticum-Medice (Medice) na metabolismus žlučových kyselin popsal Matzekis.<sup>16</sup>

#### 3.4.4.4 BIOLOGICKÉ ÚČINKY HLAVNÍCH OBSAHOVÝCH LÁTEK

Jak již bylo uvedeno, hlavními alkaloidy rostliny jsou koptisin a chelidonin. Přestože koptisin se strukturně jen málo liší od berberinu, jehož biologické účinky byly předmětem řady studií, o účincích samotného koptisinu je známo jen velmi málo. Ze starších prací pochází údaje o jeho cytotoxickém působení. Jsou popsány jeho antimikrobiální a protizánětlivé účinky. Podobně jako berberin inhiboval v dávkách 195 mg/kg/den srážení trombocytů u krys. Má též spasmolytickou a uterotonickou aktivitu. Lze očekávat, že koptisin vykazuje i řadu dalších efektů analogických berberinu.<sup>16</sup>

Druhý hlavní alkaloid chelidonin má významné spasmolytické účinky. Působí na spazmy gastrointestinálního traktu a bronchů, snižuje tonus hladkého svalstva dělohy, uretry a cév. Jeho spasmolytický účinek je poloviční ve srovnání s papaverinem. Chelidonin též snižuje krevní tlak a zpomaluje srdeční aktivitu působením přes nervus vagus. Polští autoři uvádí, že chelidonin vykazuje inhibiční účinek na dopaminergní struktury u krys v dávkách 50-200 mg/kg. Snižuje spontánní motorickou aktivitu a tělesnou teplotu. Potencuje akci hypnotik, zvyšuje tlumivý účinek reserpinu. Má cholagogní a choleretický účinek a ve žlučových cestách působí antisepticky. Má také antimutagenické účinky.<sup>16</sup>

Značná pozornost byla věnována biologickým účinkům benzofenanthridinových alkaloidů sanguinarinu a chelerythrinu, které byly izolovány i z jiných rostlinných druhů, přičemž kořen vlaštovičníku patří k jejich nejvýznamnějším zdrojům. Již dlouhou dobu jsou známy a v praxi využívány protizánětlivé a antimikrobiální účinky těchto alkaloidů. V zemích bývalého Sovětského svazu je

vyráběn preparát Sangviritrin, obsahující směs sanguinarinu a chelerythrinu. Užívá se jako zevní antimikrobiální přípravek. V Severní Americe jsou benzofenanthridinové alkaloidy součástí některých přípravků užívaných v ústní hygieně. Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a chelerythrinu na celou řadu enzymů např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu, Na / K – ATPasu, Ca – ATPasu. Oba alkaloidy působí též jako rozpojovače respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibují syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolýzu DNA. Nedávno byla popsána inhibice proteinkinasy C chelerythrinem. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Oba alkaloidy mohou reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvarterního kationu, nebo terciární báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvojvrstvy membrán. Chelerythrin, sanguinarin a chelidonin mají též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jejich působení naznačuje nedávné zjištění, že uvedené tři alkaloidy inhibují polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita těchto alkaloidů je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.<sup>16</sup>

Řada významných fyziologických účinků byla popsána u kvarterního alkaloidu berberinu, jehož zastoupení v kořeni je srovnatelné se sanguinarinem. Tento alkaloid, jehož hlavním zdrojem jsou druhy rodu *Berberis* sp., má některé účinky podobné chelidoninu. V Evropě a na Dálném východě je po mnoho staletí užíván jako prostředek proti průjmům, žloutence a chronické dysenterii. Stimuluje sekreci žluče a má rovněž hypotenzivní, vasodilatační a sedativní účinky. V *in vitro* pokusech bylo popsáno, že působí jako agonista  $\alpha$ -2 adrenoreceptorů lidských krevních destiček. Působí inhibičně na některé enzymy a má antibakteriální účinky. Řada prací se zabývá účinkem berberinu na srdeční aktivitu. V pokusech na zvířatech byly prokázány jeho pozitivní inotropní a dromotropní a negativní chronotropní efekty.<sup>16</sup>

Rovněž některé z nealkaloidních látek prokázaných v *Chelidonium majus* mají výrazné fyziologické účinky. Kyselina kávová i její estery mají spasmolytickou, cholagogní a antibakteriální aktivitu. Nebylo dosud zkoumáno, do jaké míry se na terapeutických efektech vlaštovičníku mohou podílet tyto látky.<sup>16</sup>

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

## **4.1 VŠEOBECNÉ POSTUPY**

### **4.1.1 Destilace a odpařování rozpouštědel**

Rozpouštědla byla před použitím destilována; nejprve byl zachycen předek (většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno cca 90 % zbylého objemu rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku, případně odpařením určitého množství rozpouštědla proudem dusíku na vodní lázni za normálního tlaku.

### **4.1.2 Sloupcová chromatografie**

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem stupňovité eluce na oxidu hlinitém.

Sloupec byl plněn obvyklým způsobem; nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl nanesen na roztěr s malým množstvím oxidu hlinitého po vysušení v exsikátoru.

### **4.1.3 Tenkovrstvá chromatografie**

Tenkovrstvá chromatografie byla použita v systému N komor. Komory byly použity nasyceny mobilní fází.

V případě použití malých komor (válcových) probíhalo sycení cca 30 minut, u klasických komor probíhalo sycení cca 60 minut.

Chromatografie byla prováděna vzestupně.

#### 4.1.4 Sušení

Odparky byly sušeny za normální teploty a tlaku nebo v exsikátoru za normální teploty a sníženého tlaku.

## 4.2 POTŘEBY

### 4.2.1 Izolační část

#### 4.2.1.1 CHROMATOGRAFICKÉ ADSORBENTY

##### Oxid hlinitý neutrální (Reanal) 0,1-0,2 mm

Komerční adsorbent byl suspendován v trojnásobném množství vody, po změření výluhu byla suspenze zneutralizována octovou kyselinou na pH 5. Suspenze byla povařena, odsáta ostře na nuči, suspendována několikrát v potřebném množství horké destilované vody (80 °C) a promyta, až bylo pH promývací vody prakticky neutrální. Po odsátí a několikadenním vysušení na bezprašném místě byl adsorbent aktivován 12 hodin při 200 °C, po zchladnutí v uzavřené nádobě deaktivován přídatkem 6 % vody, dobře promíchán a ponechán min. 24 hodin ekvilibrovat.

##### Oxid hlinitý kyselý 0,1-0,2 mm

Byl připraven modifikací popsané metody<sup>21</sup> z oxidu hlinitého neutrálního (Reanal): 1000 g adsorbentu bylo rozmícháno s 2 litry vodného roztoku chlorovodíku a 12 hodin mícháno vrtulovou míchačkou. Po dalších 12 hodinách (za občasného míchání) byla suspenze ostře odfiltrována přes fritu a ponechána sušit na vzduchu za nepřístupu prachu po dobu 3 dnů za občasného míchání ve vrstvě nepřevyšující 2 cm. Po této době byl adsorbent aktivován 12 hodin při 200 °C v sušárně. Kyselost takto připraveného adsorbentu byla sledována titračně ve vodné suspenzi a pohybovala se v rozmezí 3,4-3,8 ml 0,1M hydroxidu sodného/10,0 g adsorbentu.

Silufol® UV 254, Kavalier Votice, 15×15 cm

Hotové desky pro chromatografii na tenké vrstvě.

Podložka: hliníková fólie

Sorbent: Silpearl – širokoporézní silikagel podle Pitry s luminiscenčním indikátorem pro UV 254

Kieselgel F<sub>254</sub>, Merck, 5×10 cm

TLC hliníková fólie, Silikagel 60 F 254, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

#### 4.2.1.2 CHROMATOGRAFICKÉ SOUSTAVY

S1: Cyklohexan-diethylamin 9:1

#### 4.2.1.3 CHEMIKÁLIE

Kyselina sírová 96%, p. a.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a.

Chlorovodík plyný, č.

Kyselina octová 99%, p. a.

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Kyselina vinná, č.

Jodid draselný, p. a.

#### 4.2.1.4 ČINIDLA

D 1: Dragendorffovo činidlo podle Muniéra<sup>22</sup>

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné byl rozpuštěn v 80 ml vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného byl rozpuštěn ve 40 ml vody.

Zásobní roztok: byla připravena směs roztoku A a roztoku B v poměru 1 : 1 (v/v).

Tato směs může být uchovávána po dobu několika měsíců v ledničce.

Sprejové činidlo: 5 ml zásobního roztoku bylo přidáno k roztoku 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

#### 4.2.1.5 ROZPOUŠTĚDLA

Cyklohexan, č.

Diethylether, č. bez stabilizátoru

Ethanol 95% denaturovaný methanolem, č.

Chloroform, č.

Methanol, č.

Diethylamin, č.

Toluen, č.

#### 4.2.1.6 STANDARDNÍ LÁTKY

Sanguinarin-hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

### 4.2.2 Biochemická část

#### 4.2.2.1 CHEMIKÁLIE A MATERIÁL

Acetylthiocholinjodid, ≥99,0% (Fluka, Sigma-Aldrich, ČR)

DTNB, ≥98% (Sigma-Aldrich, ČR)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, p.a. (Lachema, ČR)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, p.a. (Lachema, ČR)

Ethanol (Fluka, Sigma-Aldrich, ČR)

Hemolyzát lidských erytrocytů

Plastové kyvety DISPOLABKARTELL 1937 PS MICROCUVETTES

#### 4.2.2.2. PŘÍSTROJE

Centrifuga CENTRIFUGE type MPW–340 (Mechanika precyzyjna, Polsko)

PH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontron instruments, Švýcarsko)



### 4.3 IZOLACE ALKALOIDŮ

#### 4.3.1 Materiál

Droga (sušená nať s kořeny) byla získána sběrem fy JUGODRVO AD v Chorvatsku v období července-září 2004 a po očištění sušena za normálních podmínek.

Makroskopická, mikroskopická a chemická identifikace byla provedena L. Opletalem.

Metodou dle Českého lékopisu 2005 bylo stanoveno:<sup>23</sup>

Cizí příměsi (2.8.2.):	12,2 %
Ztráta sušením (2.2.32.):	8,68 %
Celkový popel (2.4.16.):	16,8 %
Stanovení obsahu (alkaloidy jako chelidonin):	1,02 %

#### 4.3.2 Příprava extraktu a jeho čištění

41,8 kg suché nati s kořeny bylo perkolováno 95% ethanolem (celkem získáno 480 litrů extraktu), extrakt byl zahuštěn na vakuové odparce při 60 °C do maximálního odstranění alkoholu, následně byly přidány asi 2 litry vody. Vznikl temně hnědý, dehtovitý, sirupovitý odparek.

Tento extrakt byl rotací rozehrát na vodní lázni asi na 40 °C, bylo přidáno 8 litrů 1,5% kyseliny sírové (zahřáté na 40 °C) a směs byla tyčinkou dokonale promíchávána po dobu několika minut. Potom byl oranžový roztok po zchlazení dokonale slit, dehet ze dna byl seškrabán a umístěn do velké kádinky. Bylo přidáno 500 ml bezvodé kyseliny octové a na vodní lázni byla směs rozpuštěna na viskózní roztok. K tomuto roztoku bylo přidáváno po částech 7,5 litrů vody a promícháno. Kalný oranžový roztok byl slit, černý pryskyřičnatý podíl rozpuštěn znovu ve 200 ml octové kyseliny, opět zahřát a srážen 4 litry vody. Oba dekantáty byly spojeny a ponechány přes noc stát. Poté byl oranžový roztok zfiltrován přes polyamidový filtr, ten byl promyt asi 1 litrem vody a ponechán vykapat. Oba kyselé filtráty (z kyseliny sírové i octové) byly spojeny; vyloučila se bělavá sraženina. Vzniklá suspenze byla

zfiltrována znovu přes polyamidový filtr, filtr byl promyt 1,5 litrem 1,5% kyseliny sírové. Celkem bylo získáno 37 litrů filtrátu.

#### **4.3.3 Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu**

37 litrů takto připraveného kyselého oranžového roztoku síranů bylo opatrně a za stálého míchání neutralizováno nejprve pevným práškovým bezvodým uhličitánem sodným na pH cca 8 a posléze 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9. Tekutina se výrazně zakalila a vyloučil se nahnědlý sediment. Tato suspenze byla po částech postupně vytřepána 5 krát celkem 15 litry diethyletheru, etherové vrstvy byly spojeny, odděleny od zbytku vodné fáze a rozpouštědlo oddestilováno. Vzniklo 182,0 g vysoce viskózního odparku hnědé barvy, který nekrystalizoval.

#### **4.3.4 Čištění surového výtřepku A**

151,0 g tohoto odparku bylo rozpuštěno při cca 50 °C celkem ve 4,2 litrech 0,3M kyselině sírové, kalný oranžový roztok zfiltrován papírovým filtrem a čirý filtrát vytřepán 5 krát postupně 1,2 litrů diethyletheru; po zahuštění bylo zjištěno, že tento odparek je hmotnostně zcela minoritní (0,300 g) a obsahuje jen stopy Dragendorff-pozitivních látek.

#### **4.3.5 Příprava pseudokyanidů**

Ke kyselému roztoku alkaloidů byl přidáván nasycený roztok kyanidu draselného až do alkalické reakce, přičemž se vyloučilo velké množství šedavé sraženiny. Tato suspenze byla okyselena 1M kyselinou sírovou na pH 4, všechny alkaloidy kromě pseudobazí se znovu rozpustily. Suspenze byla ponechána několik hodin sedimentovat, poté byla tekutina dekantována. Zbylá suspenze byla zfiltrována přes papírový filtr a promyta několikrát malým množstvím vody. Po několikahodinovém sušení na vzduchu byla vysušena ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem a rozetřena na okrový prášek (15,7 g).

15,7 g pseudokyanidů bylo zpracováno metodou podle Gadamera (ethanol + chloroform + 36% HCl = 1:2:1) resp. suspendováno ve směsi 125 ml 95% ethanolu a 250 ml chloroformu, bylo přidáno 125 ml 36% HCl a proveden var pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Potom byl roztok na vakuové odparce odpařen do malého zbytku, zředěn 100 ml vody a zalkalizován 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9. Fialová suspenze byla vytřepána 5 krát 200 ml diethyletheru. Spojené diethyletherové výtřepky byly vytřepány 5 krát 100 ml 1M kyseliny sírové. Kyselý roztok byl zalkalizován roztokem 10% uhličitanu sodného, suspenze vytřepána 5 krát 150 ml diethyletheru. Uvedený postup byl opakován ještě jednou. Aby došlo k vyčištění alkaloidní směsi, byl získán světle hnědý, nekystalický odparek (6,01 g).

#### **4.3.6 Separace výtřepku A po odstranění benzofenanthridinových bazí**

Kyselý roztok po odstranění pseudokyanidů byl na vodní lázni zahřát na 40 °C a po dobu 15 minut míchán při dobrém odtahu digestoře. Potom byl ochlazen na teplotu místnosti, zalkalizován 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9 a vytřepán 5 krát 1,2 litry diethyletheru.

#### **4.3.7 Příprava fenolových alkaloidů z výtřepku A**

Spojené diethyletherové výtřepky byly vytřepány 3 krát 100 ml 5% NaOH, louhová vrstva zneutralizována 1M kyselinou sírovou na pH 2 a zalkalizována 10% roztokem uhličitanu sodného na pH 9. Tento roztok byl vytřepán 5 krát 100 ml diethyletheru a odpařen za vzniku minoritního hnědého, viskózního odparku (0,35 g).

#### **4.3.8 Příprava vyčištěného výtřepku A**

6 litrů diethyletherového výtřepku po odstranění fenolových bazí bylo vytřepáno 5 krát 300 ml 0,3M kyseliny sírové, roztok byl opět zneutralizován 10% roztokem uhličitanu sodného a vytřepán 5 krát 1,2 litry diethyletheru. Tento reverzní

postup byl zopakován ještě jednou; po odpaření diethyletheru vznikl bělavý krystalizující odparek (80 g).

#### **4.3.9 Příprava chloridů nerozpustných ve vodě z výtřepku A a alkaloidů z nich**

80 g krystalizující alkaloidní směsi bylo rozpuštěno ve 350 ml 0,3M kyseliny sírové, přidáno 100 ml 36% HCl a po 1 hodině odfiltrovány nerozpustné chloridy, promyty vodou, roztok doplněn na 800 ml a znova odfiltrovány chloridy. Tyto chloridy byly suspendovány (rozpuštěny) v 6,4 litru 0,3M kyseliny sírové, roztok byl zalkalizován 480 ml 25% amoniaku, bílá suspenze vytřepána 1 krát 2,5 litry diethyletheru a 2 krát 1,6 litry diethyletheru. Světle nažloutlý roztok byl odpařen za vzniku prakticky bílého odparku ( $n = 45,27$  g).

#### **4.3.10 Příprava alkaloidů z chloridů rozpustných v chloroformu (AC)**

800 ml oranžového filtrátu po oddělení nerozpustných chloridů bylo vytřepáno 6 krát 250 ml chloroformu, chloroform odpařen, zbytek rozpuštěn ve 130 ml 0,3M kyseliny sírové. Roztok byl zředěn vodou na 800 ml, alkalizován 25% amoniakem na pH 9 a vytřepán 5 krát 600 ml diethyletheru za vzniku pevného, světle hnědého odparku (3,38 g).

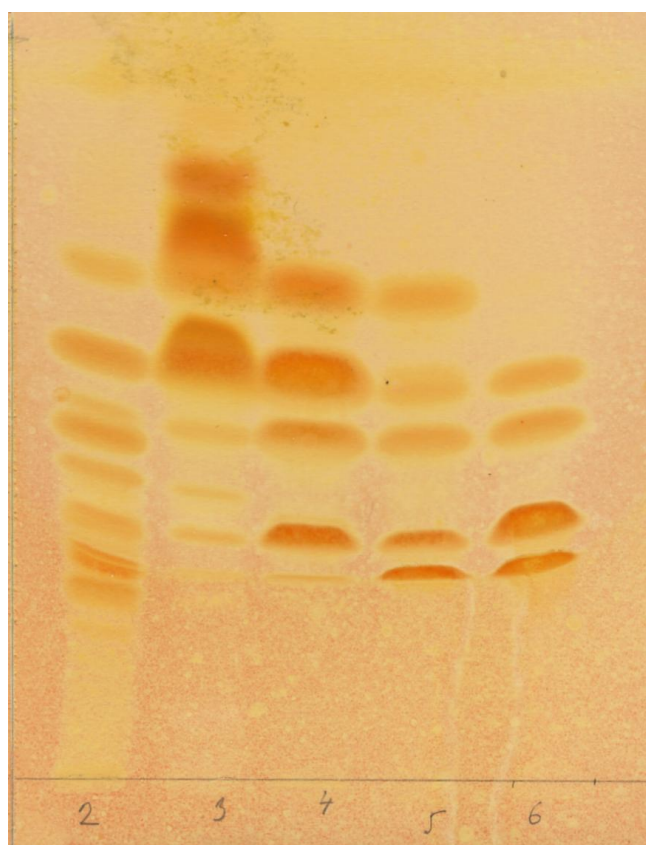
#### **4.3.11 Příprava alkaloidů z chloridů nerozpustných v chloroformu (AD)**

Zbýlý kyselý filtrát byl zneutralizován 25% amoniakem na pH 9 a vytřepán 5 krát 300 ml diethyletheru. Organická vrstva byla odpařena za vzniku bílého práškovitého odparku (15,91 g).

Tab č. 2 Výsledky přípravy výtřepků s terciárními a kvartérními bazemi z nati s kořeny.

Označení	Č. na chromatog.	Odparek (g)	Popis
L	1	0,30	Tmavě hnědý s vylouč. kryst.
A-fenoly	2	0,35	Tmavě hnědý nafouklý
A-benzofenathr.	3	6,01	Hnědý, nafouklý
Cl <sup>-</sup> nR H <sub>2</sub> O	4	45,27	Nažloutlý, prakticky krystalický
AC (R Chf)	5	3,38	Světle hnědý, tvrdý
AD (nR Chf)	6	15,91	Práškovitý, bílý

Obr. č. 7 Kontrolní TLC jednotlivých typů výtřepků z nati s kořeny vlašovičnicku (Kieselgel F<sub>254</sub>, S1, komora nasycená, vyvíjení 1 krát detekce Dragendroffovo činidlo; popis viz předešlá tabulka č.2)



#### 4.3.12 Sloupcová chromatografie benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů

Alkaloidní směs byla rozpuštěna v 20 ml chloroformu, smíchána s 20 g adsorbentu, rychle vysušena při 40 °C a dosušena 16 hodin ve vakuovém exsikátoru nad silikagelem. Potom byla nanесena na sloupec obvyklým způsobem.

Sloupec byl připraven nalitím suspenze adsorbentu ve směsi toluen nasycený vodou+octová kyselina+ethanol (97:1:2).

Adsorbent: kyselý oxid hlinitý 0,1-0,2 mm, 1520 g

Chrom. lože: vrstva s adsorbentem: 5×75 cm

vrstva s frakcí: 5×1 cm

Nanáška: 550 mg vyčištěné směsi alkaloidů z pseudokyanidů

Frakce: 250 ml

Doba toku: ~20 min.

Chromatografie byla prováděna za následujících podmínek (viz. tab. č. 3)

Tab. č. 3 Sloupcová chromatografie směsi benzofenanthridinových bazí

Souhrnná frakce	Frakce	Eluent*	Hmotnost (mg)	Popis
1-12	1-6	To-AcOH-EtOH 97:1:2	0	0
	7-12	To-AcOH-EtOH 97:1:5	30,2	Žlutohnědý, pevný
13-20	13-20	To-AcOH-EtOH 97:1:5	18,8	Žlutohnědý, pevný
21-36	21-30	To-AcOH-EtOH 97:1:6	112,4	Oranžový s krystalky
	31-36	To-AcOH-EtOH 97:1:6	62,5	Hnědooranžový, olejovitý
37-54	37-48	To-AcOH-EtOH 97:1:6	32,2	Hnědooranžový, olejovitý
	49-54	To-AcOH-EtOH 97:1:7	32,5	Oranžový, pevný
55-78	55-70	To-AcOH-EtOH 97:1:9	128,7	Intenzivně žlutý

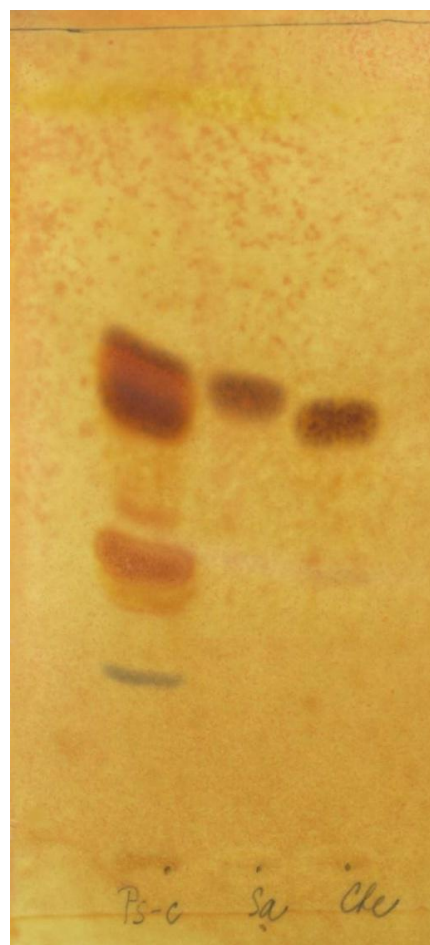
	71-78	To-AcOH-EtOH 97:1:10	38,7	Žlutohnědý, pevný
79-90	79-90	To-AcOH-EtOH 97:1:10	12,2	Hnědo-fialový, pevný

Jednotlivé frakce byly sledovány kontrolní TLC (Kieselgel F<sub>254</sub>, S1, komora nasycená, dráha 8,5 cm, Dragendorffovo činidlo) s použitím standardů sanguinarinu a chelerythrinu. Frakce stejné kvality byly spojeny a dále čištěny.

Obr. č. 8 Kontrolní TLC



Benzofenanthridinové alkaloidy  
z pseudokyanidů: viditelné světlo



Benzofenanthridinové alkaloidy  
z pseudokyanidů: Dragendorffovo činidlo

V dalším postupu jsem pracovala s látkou sanguinarin.

#### 4.3.13 Čištění frakcí 21-36 (sanguinarin)

Spojené frakce byly rozpuštěny ve směsi chloroform-ethanol 1:1 (10 ml) a za pomoci nanášecího zařízení Camag Linomat 5 bylo nanášeno 500 µg vzorku/1 cm délky chromatografické desky předem vyčištěné (vyvinuté v S1). Po vyvinutí chromatogramu byl mechanicky separován adsorbent s hlavní zónou - zónou sanguinarinu (tato zóna byla zjištěna vyvinutím separátního chromatogramu na němž byl vedle děleného vzorku nanášen standard sanguinarinu) o  $R_f=0,65-0,67$ . Adsorbent byl spojen, eluován v Pasteurově pipetě směsí chloroform-ethanol 1:1, rozpouštědlo odpařeno a odparek vysušen ve vakuu nad silikagelem. Bylo získáno 82,1 mg žluto-šedavého odparku, který byl krystalizován z 8% roztoku chlorovodíku (62,1 mg).

Adsorbent: Silufol UV 254, 15×15 cm

Vyvíjecí soustava: S1

Počet desek: 20

Nanášecí linie: 18 cm

Vyvíjecí dráha: 13 cm, vyvíjeno 1 krát

Hmotnost vzorku: 112,4 mg

#### 4.3.14 Výsledky izolace

Byl izolován sanguinarin-hydrochlorid  $C_{20}H_{15}NO_4Cl$ , (368,788), červené jehlice t. t. 275 - 277 °C (za částečného rozkladu), směsná t. t. bez deprese, chromatografické srovnání se standardem (Kieselgel  $F_{254}$ , S1, komora nasycená, Dragendorffovo činidlo,  $R_f=0,72$ ) bez rozdílu hodnot  $R_f$ .

Vypočteno C 65,31; H 3,83; N 3,80

Nalezeno C 65,02; H 3,61; N 3,71



Tab. č. 4 Chování benzofenanthridinových alkaloidů na silikagelu

Látka	viditelné	366 bez ind.	254 s ind.
Sanguinarin HCl	červený	světle červený	hnědý

#### **4.4 STANOVENÍ ÚČINKU ALKALOIDU NA ERYTROCYTÁRNÍ ACHE ( $IC_{50}$ )**

##### **4.4.1 Podmínky měření**

Experimenty byly prováděny:

při teplotě 25°C

v prostředí PB

při pH 7,4

při vlnové délce spektrofotometru 436 nm

v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm.

##### **4.4.2 Příprava hemolyzátu lidských erytrocytů**

Plná krev byla odstředěna po dobu 15 minut při 10000 ot./min. Získaná erytrocytární masa byla 3 krát promyta 0,1M fosfátovým pufrům na pH 7,4, aby byly odstraněny zbytky plazmy. 10% (v/v) hemolyzát byl připraven ve vodě.

##### **4.4.3 Stanovení hodnot $IC_{50}$**

Do kyvety byly přidány 0,4 ml roztoku DTNB v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7,4; výsledná koncentrace DTNB v kyvetě  $5 \times 10^{-3}$  M), 100  $\mu$ l hemolyzátu z erytrocytů, 50  $\mu$ l roztoku alkaloidu a 1,25 ml fosfátového pufru. Reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml roztoku acetylthiocholinu (výsl. koncentrace v kyvetě  $10^{-3}$  M) a fotometrována při

436 nm za laboratorní teploty po dobu 3 minut. Byla zaznamenávána delta absorbance, která je úměrná aktivitě erytrocytární acetylcholinesterasy.

Koncentrační řady alkaloidů byly připraveny v ethanolu tak, aby po přidání 50 µl roztoku alkaloidu byla výsledná koncentrace látky v kyvetě v rozpětí  $10^{-2} - 10^{-7}$ .<sup>24,25</sup>

Měření byla opakována pro každou koncentraci testované látky nejméně 3 krát.

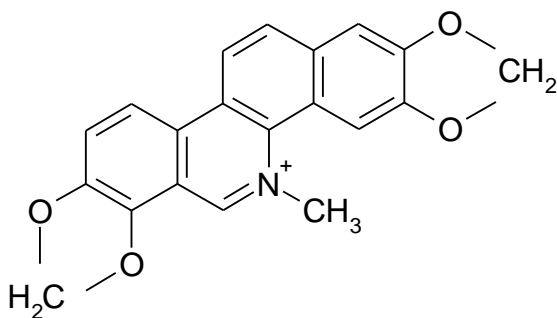
#### 4.4.4 Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty  $IC_{50}$  byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 4.4.5 Výsledky biochemické části

Tab. č. 5 Výsledky testu vlivu izolované látky na aktivitu AChE

Látka	$IC_{50}$ [M]	95% konfidenční interval [M]
Sanguinarin	$2,69 \times 10^{-5}$	$1.47 \times 10^{-5} - 4.89 \times 10^{-5}$



Sanguinarin

## **5 DISKUSE**

Léčba AD je velmi problémovou a svízelnou záležitostí. AD je totiž komplexem řady patologicko-fyziologických procesů, z nichž některé na sebe navazují a některé působí separátně. V současné době je hlavním terapeutickým zásahem zásah do aktivity mozkové AChE. Řada sloučenin má cholinomimetické účinky velmi příznivé, ale bohužel prakticky nevyužitelné. Tyto účinky jsou nejen centrální, ale i periferní a právě látky, které mají výrazné periferní účinky jsou nepoužitelné.

V oblasti přírodních látek se provádí výzkum na ovlivnění mozkové AChE a již dnes existují látky, které se používají při léčbě AD. V současné době začíná být využíván galanthamin, velmi intenzivně se pracuje na různých galanthaminových derivátech.<sup>26</sup> Fysostigmin, který je výrazným cholinomimetikem je těžko použitelný, protože má výrazné vedlejší účinky. Další velmi perspektivní přírodní látkou je alkaloid izolovaný z některých zástupců čeledi Lycopodiaceae – Huperzin A. Huperzin A vytváří nejen velice stabilní, avšak reverzibilní komplex s AChE, ale má i řadu dalších významných farmakologických vlastností, např. chrání neurony před toxickým účinkem glutamátu.<sup>27</sup> Podává se v podstatně nižších dávkách než galanthamin, jeho dosažitelnost je však v současné době poněkud obtížnější než u jiných přírodních látek. Nicméně rozsáhlé syntetické studie ukazují, že tato látka bude přístupná totální syntézou.<sup>28</sup> Tato látka je velkou nadějí, protože syntetické látky v současnosti používané (donepezil, takrin) nenaplnují terapeutické potřeby našich představ. Takrin je v této době už léčivem prakticky nevyužívaným.

Jako velmi nadějně se kromě různých syntetických látek ukazují i některé další látky: zeatin (*Fiatoua villosa*, Orchidaceae, *Zea mays*, Poaceae), dehydroevodiamin (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae), (+)-homomoenjadaramin, moenjadaramin (*Buxus hyrcana*, Buxaceae), cykloprotobuxin C, cyklovirobuxein A, cyklomikrofilin A (*Buxus papillosa*, Buxaceae) a další.<sup>12</sup> Z hlediska preparativního jsou atraktivní alkaloidy, a to tím, že se s nimi podstatně lépe pracuje než s neutrálními sloučeninami (lze je rychleji a méně nákladně čistit).

Jedna z rostlin, u kterých se vyskytly alkaloidy biologicky aktivní vůči AChE, je vlaštovičník větší, *Chelidonium majus*. Jak nať, tak kořeny obsahují základní 4 typy alkaloidů: benzofenanthridinový, protoberberinový, protopinový, aporfinový. Jeho výzkum se v poslední době poměrně rozšiřuje patrně z důvodu antineoplastického účinku alkaloidního přípravku nazývaného Ukrain (preparát obsahuje extrakt alkaloidů z *Chelidonium majus* konjugovaných s kyselinou thiofosforečnou).<sup>16</sup> V souvislosti s tímto studiem je však studována řada alkaloidů i na jiné účinky, např.

efekt benzofenanthridinových alkaloidů na lidské keratinocyty<sup>17</sup>, inhibiční vliv na 5 a 12 lipoxygenasu neredoxním mechanismem<sup>18</sup> a další.

V poslední době je věnována také pozornost vlivu vlaštovičnickových alkaloidů na hydrolýzu acetylthiocholinu a acetylcholinesterasu (také podobných alkaloidů izolovaných z *Bocconia cordata*<sup>29</sup>) zejména chelidoninu, sanguinarinu, chelerythrinu a také Ukrainu.

Izolovaný sanguinarin má kromě antimikrobiálních, protizánětlivých, antioxidačních a antineoplastických účinků i účinky toxické, které limitují jeho použití. Byly pozorovány pozitivně inotropní účinky na srdečním svalu. Sanguinarin způsobuje kontrakce levé komory a obou síní a inhibuje spontánní rytmus pravé síně.<sup>30</sup> V nedávné době byl pozorován zvýšený výskyt karcinomu žlučníku v Indii v souvislosti s konzumací hořčičného oleje. Tento olej obsahuje stopy oleje obsahující alkaloid sanguinarin. Jelikož jsou známy interkalační účinky sanguinarinu, byla studována souvislost v poškození DNA s karcinogenním potenciálem.<sup>31</sup>

Sanguinarin je v mnoha zemích používán v ústní hygieně při prevenci zubního plaku.<sup>32</sup> Dále bylo studováno jeho možné využití při léčbě a prevenci u pacientů s rakovinou prostaty.<sup>33</sup> Byly pozorovány jeho účinky na *Helicobacter pylori*.<sup>34</sup> Z dalších účinků byl zjištěn vliv na MAO<sup>35</sup> a HIV-proteasu.<sup>36</sup> Byly popsány inhibiční účinky sanguinarinu a na celou řadu dalších enzymů např. na cholinesterasy, alaninaminotransferasu, Na / K – ATPasu, Ca – ATPasu. Dále působí jako rozpojovač respirace a oxidační fosforylace. S nativní dvouspirálou DNA vytváří komplexy typu interkalace, inhibuje syntézu RNA na DNA matrici a enzymovou hydrolýzu DNA. Většina těchto inhibičních účinků je připisována interakci benzofenanthridinů s SH-skupinami enzymů. Sanguinarin může reagovat v závislosti na pH buď ve formě kvarterního kationu, nebo terciární báze. Sanguinarin rovněž zvyšuje vodivost lipidové dvojvrstvy membrán a má též prokazatelné antimitotické účinky. Zdá se, že mechanismus jeho působení naznačuje nedávné zjištění, že inhibuje polymeraci tubulinu. Lze předpokládat, že antimikrobiální i cytostatická aktivita sanguinarinu je podmíněna výše uvedenými účinky na řadu klíčových enzymů buněčného metabolismu.<sup>16</sup>

Cílem práce bylo provést pokus o izolaci alkaloidů z vlaštovičnicku většího a tyto alkaloidy podrobit testování vlivu na erytrocytární AChE. K této izolaci bylo použito 41,8 kg celé usušené rostliny (nať a kořeny). Izolační postup byl použit, jak je uvedeno v literatuře prof. Slavíkem,<sup>37</sup> jehož pracovní skupina se alkaloidy z čeledi

Papaveraceae (pouze z preparativního hlediska) zabývala od padesátých do sedmdesátých let minulého století. Pro tyto izolace používala pracovní skupina sofistikovanou a velice logickou metodu: rostlinná část byla extrahována methanolem nebo ethanolem. Po odstranění rozpouštědel byl odparek roztřepán se slabým roztokem kyseliny sírové a filtrován. Prakticky neutrální alkaloidy a neutrální znečištění byly odstraněny vytřepáním tohoto roztoku etherem. Vodná vrstva byla zalkalizována uhličitánem sodným (pH 9-10), vyloučené alkaloidy výtřepány etherem, zbylá vodná vrstva zalkalizována na pH 12-12,5 a silné baze vytřepány opět do etheru. Etherový výtřepek, který byl získán alkalizací uhličitánem sodným obsahoval středně bazické alkaloidy. Byl dále separován přípravou pseudokyanidů (ps-kyanidů, sanguinarinové baze vytvářejí ps-kyanidy). Zbylý roztok po ps-kyanidech byl zpracován s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na chloridy rozpustné ve vodě a chloridy ve vodě nerozpustné. Nakonec byly z těchto frakcí odděleny chloridy fenolové od nefenolových. Já jsem se zabývala izolací alkaloidů, které vytvářejí ps-kyanidy, které byly dále zpracovány metodou dle Gadamera. Slavíkův postup je velmi logický a historicky patrně osvědčený. Bohužel se však ukázalo, že v našich podmínkách postup nepřinesl tak jednoznačné výsledky jak popisuje Slavíkova skupina (jednotlivým vytřepáváním a frakční krystalizací rozdělila tato skupina látky až do čistého stavu). Opakování postupu bylo pro moji práci velmi přínosné, ale dočištění do konečného čistého stavu muselo být provedeno kombinací sloupcové a tenkovrstvé chromatografie.

Izolovaný sanguinarin má t. t. 275 - 277 °C. Pomocí preparativní TLC se podařilo alkaloid získat v čisté formě. Zároveň byla totiž provena kontrolní TLC standardu sanguinarinu a byl mechanicky separován adsorbent s hlavní zónou - zónou sanguinarinu. Srovnáním dalších fyzikálně chemických charakteristik, jak experimentálně se vzorkem autentické látky, tak s údaji v literatuře se prokázalo, že se jedná o sanguinarin.

Dále byla tato látka podrobena testu na ovlivnění aktivity erytrocytární AChE. Podle naměřené hodnoty  $IC_{50}=2,69 \times 10^{-5}$  M lze usoudit, že se jedná o látku se zajímavým biologickým účinkem. Usuzuji tak ze srovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterasy (galanthaminu  $IC_{50}=12,59 \times 10^{-6}$  M a fysostigminu  $IC_{50}=1,26 \times 10^{-6}$  M).<sup>28</sup> Pro porovnání by bylo ideální, kdyby byla obě měření provedena na AChE stejného původu. V případě standardních alkaloidů byla ale použita AChE z krysího mozku.

## **6    SOUHRN**

Z 41,8 kg celé usušené rostliny byly získány jednotlivé výtřepky. Extrakce byla provedena společně s dalšími doktorandkami Janou Nagyovou, Evou Vítkovou a Dagmar Kubicovou. Z výtřepku A (151,0 g; světlé medové barvy, vysoce viskózní, nekystalizující) byly získány ps-kyanidy (15,7 g, prášek okrové barvy), které byly upraveny metodou podle Gadamera (6,01 g, světle hnědý, nekystalický odparek).

Dále postup pokračoval sloupcovou chromatografií, kde byly získány jednotlivé frakce. Já jsem se věnovala frakcím 21 až 36 (oranžová s krystalky), ze kterých byl pomocí TLC izolován sanguinarin (62,1 mg, červené krystalky).

Byla stanovena teplota tání izolované látky (275 - 277 °C).

Na konci práce byl určen inhibiční vliv izolované látky na aktivitu erytrocytární AChE.  $IC_{50}$  má hodnotu  $2,69 \times 10^{-5}$  M. Tato hodnota ukazuje v porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterasy (galanthaminu a fysostigminu), že se jedná o látku se zajímavým biologickým účinkem.



## **7 LITERATURA**

- 
- <sup>1</sup> [www.alzheimerforum.cz](http://www.alzheimerforum.cz) (12. 4. 2007).
- <sup>2</sup> Pydychová, E.: Alzheimerova nemoc. Solutio, 2002/2003, 21-30 (2002).
- <sup>3</sup> [www.stari.cz](http://www.stari.cz) (12.4.2007).
- <sup>4</sup> [www.pharmanews.cz/2005\\_05/alzheimer.htm](http://www.pharmanews.cz/2005_05/alzheimer.htm) (30. 4. 2006).
- <sup>5</sup> Opletal, L., Opletalová, V.: Pokroky ve vývoji cholinergik pro léčbu Alzheimerovy demence. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12. – 14. 9. 2005, s. 27.
- <sup>6</sup> Koukolík, F., Jiráček R.: Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publishing, Praha 1998, s. 213-229.
- <sup>7</sup> Giacobini, E.: Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. Neurochem. Res. **28**(3-4), 515-22 (2003).
- <sup>8</sup> Greig, N. H., Lahiri, D. K., Sambamurti, K.: Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. Int. Psychogeriatr. **14**(1), 77-91 (2002).
- <sup>9</sup> Abe, Y., Aoyagi, A., Hara, T., Abe, K., Yamazaki, R., Kumagae, Y., Naruto, S., Koyama, K., Marumoto, S., Tago, K., Toda, N., Takami, K., Yamada, N., Ori, M., Kogen, H., Kaneko, T.: Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. J. Pharmacol. Sci. **93**(1), 95-105 (2003).
- <sup>10</sup> Toda, N., Tago, K., Marumoto, S., Takami, K., Ori, M., Yamada, N., Koyama, K., Naruto, S., Abe, K., Yamazaki, R., Hara, T., Aoyagi, A., Abe, Y., Kaneko, T., Kogen, H.: A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. Bioorg. Med. Chem. **11**(20), 4389-415 (2003).
- <sup>11</sup> Houghton, P.; Howes, M. J.: Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease. Pharmacognos. Res. **14**(1-2), 6-22 (2005).
- <sup>12</sup> Opletal, L., Opletalová, V.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. Sborník abstraktů z 34. konference: Syntéza a analýza léčiv. Brno 12. – 14. 9. 2005, s. 26.
- <sup>13</sup> Zaheer-UI-Haq, Z. U., Wellenzohn, B., Liedl, K. R., Rode, B. M.: Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. J. Med. Chem. **46**(23), 5087-90 (2003).
- <sup>14</sup> Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.: Enantiomer effects of huperzine A on the aryl acylamidase activity of human cholinesterases. Cell. Mol. Neurobiol. **23**(1), 93-100 (2003).
- <sup>15</sup> Cordato, D. J., Mather, L. E., Herkes, G. K.: Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective. J. Clin. Neurosci. **10**(6), 649-54 (2003).
- <sup>16</sup> Táborská, E., Bochořáková, H., Dostál, J., Paulová, H.: Vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.) – přehled současného stavu poznatků. Česk. Slov. Farm. **44**(2), 71-75 (1995).

- 
- <sup>17</sup> Vavreckova, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 2. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta. Med.* **62**(6), 491-494 (1996).
- <sup>18</sup> Vavreckova, C., Gawlik, I., Mueller, K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*. Part 1. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by non-redox mechanism. *Planta. Med.* **62**(5), 397-401 (1996).
- <sup>19</sup> Jirásek, V., Starý, F.: *Atlas léčivých rostlin*. SPN, Praha 1986, s. 108.
- <sup>20</sup> Blaschek, W., Ebel, S., Hackental, E., Holtzgrave, U., Kellner, K., Reichling, J., Schnetz, V. et. al.: *Hager ROM 2004: Hager's Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Springer & Info II Uni. Würzburg, Würzburg 2005.
- <sup>21</sup> Slavík, J., Slavíková, L.: Alkaloide der Mohngewächse (*Papaveraceae*) XVII. Über neue Alkaloide aus *Sanguinaria canadensis* L. *Coll. Czech Chem. Commun.* **25**, 1667-1675 (1960).
- <sup>22</sup> Stahl, E.: *Thin-Layer Chromatography*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1969, s. 873.
- <sup>23</sup> Český lékopis 2005, Doplněk 2006, elektronická verze, Grada Publ. a. s., Praha 2006.
- <sup>24</sup> Bajgar J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy* **XLI** (2), 78-80 (1972).
- <sup>25</sup> Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).
- <sup>26</sup> Bores, G. M., Kosley, R. W. Jr.: Galanthamin derivatives for treatment of Alzheimer's diseases. *Drugs Fut.* **21**(6), 621-635 (1996).
- <sup>27</sup> [www.alzheimerforum.cz/alternativa](http://www.alzheimerforum.cz/alternativa) (12.4.2007).
- <sup>28</sup> Tang, X. C., He, X. C., Bai, D. L.: Huperzin A: A novel acetylcholinesterase inhibitor. *Drugs Fut.* **24**(6), 647-663 (1999).
- <sup>29</sup> Kuznetsová, L. P., Nikol'skaya, E. B., Sochilina, E. E., Fadeeva, M. D.: Inhibition of enzymatic hydrolysis of acetylcholin with acetylcholinesterase by principal alkaloids isolated from *Chelidonium majus* and *Macleya* and by derivate drugs. *Tsitologiya* **43**(11), 1046-1050 (2001). *Chem. Abst.* **137**, 210505 (2002).
- <sup>30</sup> Hu, C. M.; Cheng, Y. W.; Liao, J. W.; Cheng, H. W.; Kang, J. J.. Induction of contracture and extracellular  $Ca^{2+}$  influx in cardiac muscle by sanguinarine: a study on cardiotoxicity of sanguinarine. *J. of Biomed. Sci.* **12**(2), 399-407 (2005).
- <sup>31</sup> Das, M.; Ansari, K. M.; Dhawan, A.; Shukla, Y.; Khanna, S. K.: Correlation of DNA damage in epidemic dropsy patients to carcinogenic potential of argemone oil and isolated sanguinarine alkaloid in mice. *Int. J. Canc.* **117**(5), 709-717 (2005).

- 
- <sup>32</sup> Das, A.; Mukherjee, A.; Chakrabarti, J.: Sanguinarine: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity Mutation Research, Gen. Toxicol. Environ. Mutag. **563**(1), 81-87 (2004).
- <sup>33</sup> Adhami, V. M.; Aziz, M. H.; Reagan-Shaw, S. R.; Nihal, M.; Mukhtar, H.; Ahmed, N.: Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. Mol. Cancer. Ther. **3**(8), 933-940 (2004).
- <sup>34</sup> Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Stoia, A.; Chadwick, L. R.: *In vitro* susceptibility of Helicobacter pylori to isoquinoline alkaloids from Sanguinaria canadensis and Hydrastis canadensis. Phytother. Res. **17**(3), 217-221 (2003).
- <sup>35</sup> Lee, S. S.; Kai, M.; Lee, M. K.: Inhibitory effects of sanguinarine on monoamine oxidase activity in mouse brain. Phytother. Res. , **15**(2), 167-169 (2001).
- <sup>36</sup> Cheng, T.-J.; Goodsell, D.; Kan, C.-C.: Identification of sanguinarine as a novel HIV protease inhibitor from high-throughput screening of 2000 drugs and natural products with a cell-based assay. Lett. Drug Design Discov. **2** (5), 364-371 (2005).
- <sup>37</sup> Slavík, J.: Alkaloidy rostlin mákovitých (*Papaveraceae*) I., Látky z vlaštovičníku (*Chelidonium majus* L.). Českoslov. Farm. **1**, 15-17 (1954).

---

## **Abstrakt**

Bryndová, Š.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVI. Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterasu, Rigorózní práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hr. Králové, 71 stran.

**Klíčová slova:** Alzheimerova choroba, alkaloidy, *Chelidonium majus*, acetylcholinesterasa, biologická aktivita.

V rámci screeningu rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterasy byl podroben studiu vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L., *Papaveraceae*). K izolaci alkaloidů bylo použito 41,8 kg celé sušené rostliny (nať a kořen); z vyčištěného ethanolového extraktu byly získány směsi pseudokyanidů benzofenanthridinových alkaloidů, dále fenolové baze a alkaloidy z chloridů rozpustných i nerozpustných v chloroformu.

Zabývala jsem se dělením benzofenanthridinových alkaloidů připravených z pseudokyanidů; z této směsi jsem kombinací sloupcové a tenkovrstvé chromatografie izolovala sanguinarin ve formě chloridu (porovnáním s autentickým standardem a porovnáním fyzikálně-chemických charakteristik izolované látky s údaji v literatuře).

Biologická aktivita (inhibice lidské erytrocytární acetylcholinesterasy) byla  $IC_{50}$   $2,69 \times 10^{-5}$  M. V porovnání s biologickou aktivitou standardních alkaloidních inhibitorů acetylcholinesterasy (galanthaminu a fysostigminu) se jedná o látku, která je zajímavá z hlediska dalšího studia přírodních látek, které by se mohly uplatnit jako výchozí struktury pro studium potenciálních léčiv vůči Alzheimerově chorobě.

---

## **Abstract**

Bryndová, Š.: Biological activity of plant metabolites XVI. Influence of alkaloids from *Chelidonium majus* L. on acetylcholinesterase, Rigorous work, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, 71 pp.

**Key words:** Alzheimer's disease, alkaloids, *Chelidonium majus*, acetylcholinesterase, biological activity.

Within the screening of plants that contain alkaloids inhibiting the activity of the human erythrocytic acetylcholinesterase Greater celadine (*Chelidonium majus* L., *Papaveraceae*) was studied. 41,8 kg of the whole dry plant (the aerial part with the roots) served for the isolation of alkaloids. Mixtures of pseudocyanides of benzophenanthridine alkaloids, phenolic bases, and the alkaloids precipitated from either chloroform-soluble or chloroform-insoluble chlorides were obtained from the purified ethanolic extract. My task was to separate benzofenanthridine alkaloids from pseudocyanides. Using both column and thin layer chromatography sanguinarine as a chloride was isolated. The identity of the isolated alkaloid was determined by means of an authentic standard and by comparing its physico-chemical characteristics with the published data.

The isolated compound inhibited the human erythrocytic acetylcholinesterase with  $IC_{50} 2,69 \times 10^{-5}$  M. Comparing its biological activity with that of standard alkaloid inhibitors (galanthamine and physostigmine) the isolated substance is an interesting regarding further studies of natural products that could serve as lead compounds for the development of potential drugs against the Alzheimer's disease.

---

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci na téma „Biologická aktivita obsahových látek rostlin XVI. Vliv alkaloidů z *Chelidonium majus* L. na acetylcholinesterázu“ vypracovala samostatně s konzultací mého školitele. Použité prameny jsou uvedeny v literárních odkazech.

V Hradci Králové 16.8.2007

.....

Šárka Bryndová

---